Untersuchungen zum Metabolismus von Cyclophosphamid : Isolierung und Synthese des primären Metaboliten

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Manfred Sonneborn

aus Wilhelmshaven

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Untersuchungen zum Metabolismus von Cyclophosphamid : Isolierung und Synthese des primären Metaboliten

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Manfred Sonneborn

aus Wilhelmshaven

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn als
Dissertation angenommen am 6. 5. 1969
Tag der mündlichen Prüfung 14. 5. 1969
Berichterstatter : Prof. Dr. rer. nat. F. W. Zilliken
Mitberichterstatter : Prof. Dr. phil. K. Starke

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

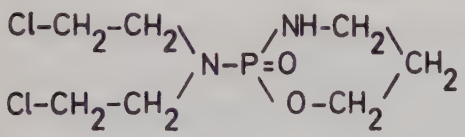
		Seite
I.	Einleitung und Problemstellung	1
II.	Untersuchungen zur biologischen Metabolisierung des Cyclophosphamid	5
II. 1.	Isolierung und Charakterisierung von biologisch aktiviertem Cyclophosphamid	5
II. 2.	Oxydation von Cyclophosphamid durch Modell-Enzym-Systeme	21
III.	Synthese	23
III. 1.	N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäureamid-chlorid-ester [XII]	24
III. 2.	N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester [XIII]	26
III. 3.	Derivate des N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester[XIII]	28
III. 3. 1.	Lithium-, Natrium- und Kalium-Salz [XIII]	28
III. 3. 2.	Calcium- und Barium-Salz [XIII]	29
III. 3. 3.	Umsetzung von [XIII] mit Triäthylamin	30
III. 3. 4.	Analytische Daten	31
III. 4.	Radioaktive Synthese	31
III. 4. 1.	N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-phosphorsäure-amid-dichlorid und N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester	36
III. 4. 2.	3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure und N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-^{3}H-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester	37
IV.	Vergleichende Untersuchungen von biologischem Metabolit (Rf 0. 86) aus Cyclophosphamid und Syntheseprodukt [XIII]	41

		Seite
V.	Diskussion	45
VI.	Methodik	51
VI. 1. 1.	Aktivierung von Cyclophosphamid mit Leberschnitten	51
VI. 1. 2.	Aktivierung von radioaktiv markiertem Cyclophosphamid mit Leberschnitten	52
VI. 1. 3.	Gewinnung von Metaboliten des Cyclophosphamid aus Serum	52
VI. 2.	Papierchromatographie	53
VI. 3.	Hochspannungselektrophorese	53
VI. 4.	Anionenaustauscher-Chromatographie	54
VI. 5.	Bestimmung der alkylierenden Aktivität (NBP-Test)	56
VI. 6.	Radioaktivitätsmessungen	56
VI. 7.	Bicarbonat-Extraktion	57
VI. 8.	Darstellung der Ausgangsverbindungen	57
VI. 8. 1.	N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid	57
VI. 8. 1. 1.	Reinigung von N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid	57
VI. 8. 1. 2.	Darstellung von ^{3}H-markiertem N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid	58
VI. 8. 2.	3-Hydroxy-propionsäure	58
VI. 8. 2. 1.	Reinigung der 3-Hydroxy-propionsäure	58
VI. 8. 2. 2.	Darstellung von ^{3}H-markierter 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure	59
VI. 9.	Darstellung von N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäureamid-chlorid-ester	59
VI. 10.	Darstellung von N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester	60
VI. 11.	Derivate des N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester	61

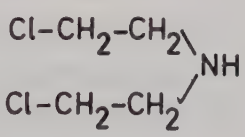
		Seite
VI. 11. 1.	Darstellung als Li-Salz und K-Salz	61
VI. 11. 2.	Darstellung als Ca-Salz und Ba-Salz	62
VI. 11. 3.	Umsetzung mit Triäthylamin	63
VI. 12.	Radioaktive Synthese von markiertem N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester	63
VI. 12. 1.	Markierung mit ^{3}H in der N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-Gruppierung des Moleküls	63
VI. 12. 2.	Markierung mit ^{3}H in der 2-Carboxy-äthyl-Gruppierung des Moleküls	64
VII.	Zusammenfassung	65
VIII.	Literaturverzeichnis	67

I. Einleitung und Problemstellung

Das Cytostaticum Cyclophosphamid *, N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-N',O-propylen-phosphorsäurediamid-ester [I], ist ein chemisch stabiles Derivat des Nor-N-Lost, N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-amin [II]. Es zeigt im Gegensatz zu Nor-N-Lost keine alkylierenden Eigenschaften und wirkt in vitro auf normale und maligne Zellen nicht cytotoxisch. In vivo ist es dagegen im Chemotherapieversuch gegen viele experimentelle Tumoren hoch aktiv. Seine Toxizität ist im Vergleich zu den unmittelbar alkylierungsfähigen Lost-Verbindungen stark herabgesetzt (1, 10).



I



II

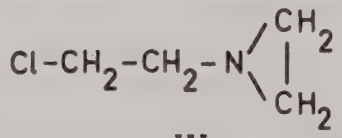
Das führte zu der Schlußfolgerung, daß das Cyclophosphamid selbst eine unwirksame "Transportform" darstellt, die erst im lebenden Organismus zu einer "Wirkform" aktiviert wird (1).
Auf der Verwirklichung dieses Prinzips (15) sollen nach Angabe der Hersteller die günstigen therapeutischen Eigenschaften beruhen (11), so daß Cyclophosphamid für die Chemotherapie des Krebses und neuerdings auch bei Autoimmunkrankheiten pharmakologisch und klinisch besondere Bedeutung erlangt hat.

In den vergangenen Jahren befaßten sich verschiedene Arbeitskreise mit der Frage nach der Natur und der Lokalisation dieses biologischen Umwandlungsprozesses des Cyclophosphamid (3, 7, 16, 21, 22, 24, 29, 33).

---

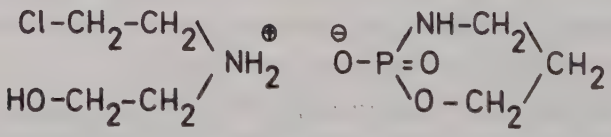
* Endoxan ®, Asta-Werke AG., Brackwede (Westf.)

ARNOLD (2, 3, 22) und später RAUEN (27, 28) hielten Nor-N-Lost [II], ein Hydrolyseprodukt des Cyclophosphamid, und N-(2-chlor-äthyl)-aziridin [III], ein Abbauprodukt des Nor-N-Lost, für die cytostatisch aktiven Metabolite. Danach sollten in vivo die gleichen Verbindungen entstehen, die bei der chemischen Hydrolyse von Cyclophosphamid nachgewiesen wurden.



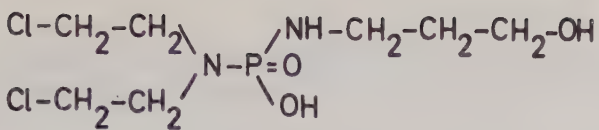
III

Durch Variation der Hydrolysebedingungen gelang es diesen Autoren (4), das Cyclophosphamid hydrolytisch zum N-(2-Hydroxy-äthyl)-N-(2-chlor-äthyl)-ammonium-Salz des cyclo-N, O-Propylen-phosphorsäureamid-esters zu spalten. Auch diese Verbindungen [IV] wurde als biologisches Umwandlungsprodukt des Cyclophosphamid diskutiert (33).



IV

BACK und Mitarbeiter (7) schlossen aus ihren Versuchen, daß weder Nor-N-Lost [II] noch, wie von FRIEDMAN (18) vermutet, Cytoxylalkohol, N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-N'-(3-hydroxy-propyl)-phosphorsäure-diamid [V], mit den cytostatisch aktiven Cyclophosphamid-Metaboliten übereinstimmen können, da die akute Toxizität von aktiviertem Cyclophosphamid, Nor-N-Lost und Cytoxylalkohol bei Mäusen in verschiedenen Größenordnungen liegt.



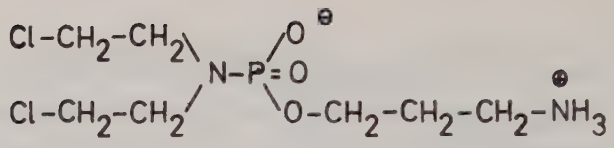
V

Zu dem gleichen Ergebnis kamen HOHORST, ZIEMANN und BROCK (25), die in vivo keine hydrolytische Freisetzung von alkylierungsfähigen Metaboliten beobachteten. Nach ihren Untersuchungen findet die Aktivierung in der Leber statt und zwar vor allem in den Mikrosomen (12, 13). Eine Bildung von aktiven Metaboliten aus Cyclophosphamid verläuft nur in Gegenwart von $NADPH_2$ oder einem $NADPH_2$-regenerierenden System und Sauerstoff. Stickstoff dagegen verhindert die Aktivierung. Hemmstoffe der mikrosomalen Hydroxylasen, wie z. B. α, α-Diphenyl-$\dot{\alpha}$-propyl-essigsäure-ß'-diäthyl-aminoäthylester (SKF 525-A), drücken den Grad der Aktivierung erheblich herab (13).

Zur Frage des Chemismus der Cyclophosphamid-Umwandlung bewiesen HOHORST und Mitarbeiter (24), daß in vivo zwei Metabolite gebildet werden, die alkylierend und cytotoxisch wirksam sind. Sie konnten nach Applikation von Cyclophosphamid aus Rattenserum und aus menschlichem Harn papierchromatographisch isoliert und durch ihre Rf-Werte charakterisiert werden. Analysendaten und chemisches Verhalten deuteten darauf hin, daß die Struktur des primären, aktiven Metaboliten, charakterisiert durch den Rf-Wert 0.86*, mit dem von ARNOLD (5) synthetisierten ringoffenen Cyclophosphamid-Derivat N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(3-amino-propyl)-phosphorsäureamid-ester [VI] weitgehend übereinstimmt, jedoch nicht identisch ist.

---

* Rf 0.86 im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser 6 : 2 : 2; nach neueren Untersuchungen mit gereinigten tritiierten Verbindungen.



VI

Im Rahmen dieser Arbeit soll die chemische Natur des primären, cytostatischen Metaboliten (Rf 0.86) und damit der Chemismus der biologischen Umwandlung von Cyclophosphamid in cytostatische und alkylierende Metabolite weiter aufgeklärt werden.

II. Untersuchungen zur biologischen Metabolisierung des Cyclophosphamid.

II. 1. Isolierung und Charakterisierung von biologisch aktiviertem Cyclophosphamid.

Es war bekannt, daß sich Metabolite des Cyclophosphamid aus Serum an einen Anionenaustauscher adsorbieren lassen (24). Daher lag es nahe, diese Metabolite mit Hilfe einer Mikro-Ionenaustauscherchromatographie (35), die zur Trennung von Nucleotiden entwickelt worden war, chromatographisch aufzutrennen, zu isolieren und ihre Struktur zu untersuchen.

Hierzu werden zunächst 50 mg ^{3}H-markiertes Cyclophosphamid (spezifische Radioaktivität 25 μC/mg) mit Rattenleberschnitten 60 min. bei 37 ^{o} C inkubiert (13), das Inkubat enteiweißt, neutralisiert und mit Dichlormethan von nicht umgesetztem Cyclophosphamid und gebildetem Nor-N-Lost befreit. Die Metabolite, die in dem so vorbereiteten Inkubat vorliegen, gibt man auf eine Mikro-Anionenaustauschersäule, 4 x 700 mm, gefüllt mit Dowex 2 x 8 in der Formiat-Form, auf.

Adsorbiert werden 58 % der Radioaktivität des Inkubates; der Rest läßt sich in der Kälte bei 4 ^{o} C mit Wasser auswaschen. Untersucht man diesen Wasservorlauf im Papierchromatogramm, System Butanol/ Eisessig/Wasser, so findet man Rf-Werte unterhalb von 0.62, die neutralen oder kationischen Metaboliten, u. a. dem Nor-N-Lost [II] und vor allem seinem Zerfallsprodukt, dem Aziridin [III], zugeordnet werden können. Das läßt sich bestätigen, wenn man den Wasservorlauf mit Dichlormethan ausschüttelt : 50 % der Radioaktivität des Wasservorlaufs sind extrahierbar und im Papierchromatogramm der Dichlormethan-Phase ist bei Rf 0.62 Nor-N-Lost und bei Rf 0.45 N-(2-Chlor-äthyl)-aziridin nachweisbar.

Die Metabolite, die am Anionenaustauscher gebunden bleiben, können mit einem Gradienten steigender Ameisensäurekonzentration nacheinander eluiert werden. Insgesamt findet man sieben radioaktive Fraktionen (Abb. 1) S 1 bis S 7. Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität in diesen Fraktionen und im Wasservorlauf sowie die durch Papierchromatographie zugeordneten Rf-Werte sind aus Tab. 1 zu ersehen.

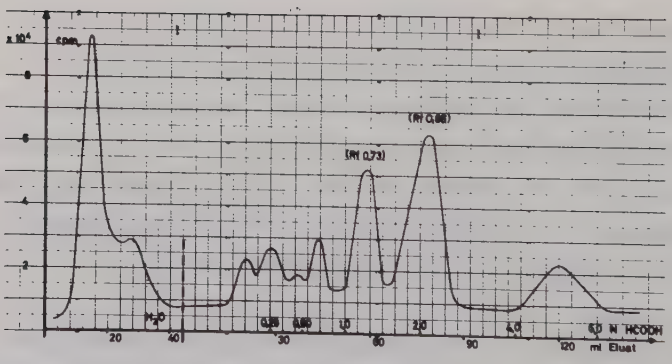


Abb. 1 : Anionenaustauscherchromatogramm eines Leberschnittinkubates von Cyclophosphamid.

Leberschnitte (Ratte), 60 min. Inkubation in Ringer-Lösung mit (1 mg/ml) ^{3}H-Cyclophosphamid (spezifische Radioaktivität 250 μC/mg). Neutralisation des Perchlorsäureextraktes und Ausschütteln mit Dichlormethan. Papierchromatographisch ermittelte Rf-Werte der Fraktionen in Klammern.

Fraktion	Elutions-volumen ml	^{3}H-Aktivität % *	identifiziert als Rf **
H_2O-Vorlauf		42.0	0.62; 0.55; 0.45 u.a. Aziridine und Nor-N-Lost
S 1	20	2.7	
S 2	30	8.3	0.32
S 3	35	3.2	0.45
S 4	40	6.6	0.60
S 5	60	14.1	0.73
S 6	80	16.8	0.86
S 7	130	6.3	

Tab. 1:

Relative Verteilung der Radioaktivität von Cyclophosphamid-Metaboliten im Anionenaustauscher-Chromatogramm eines Leberschnittinkubates (vgl. Abb. 1).

Mittelwerte aus 9 Versuchen.

* prozentuale Radioaktivität der einzelnen Fraktionen bezogen auf die gesamte Radioaktivität des Inkubates nach Extraktion mit Dichlormethan, ermittelt durch Ausplanimetrieren der Gipfel im Ionenaustauscherchromatogramm (vgl. Abb. 1).

** nachgewiesen im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2).

Leberschnitte (Ratte), 60 min. Inkubation in Ringer-Lösung mit 50 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (spezif. Radioaktivität 250 μC/mg).

Bei +4°C Anionenaustauscherchromatographie des neutralisierten Perchlorsäure-Extraktes des Leberschnittinkubates, ausgeschüttelt mit Dichlormethan. Elutionsgradient : hergestellt aus 50 ml Wasser, 50 ml Wasser und 50 ml 8 N Ameisensäure (s. VI. 4.).

Die beiden Metabolite, charakterisiert durch Rf 0.86 bzw. 0.73 im Papierchromatogramm, befanden sich in den Fraktionen S 6 bzw. S 5. Auf beide zusammen entfallen 30 % der Radioaktivität der wässrigen Phase des Leberschnittinkubates und mindestens 80 % der gesamten alkylierenden Aktivität, gemessen im Test mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin, modifiziert nach FRIEDMAN und BOGER (19).

Annähernd die gleiche prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Wasservorlauf und in den sieben mit Ameisensäure eluierten Fraktionen kann man im Anionenaustauscherchromatogramm von Metaboliten des Cyclophosphamid aus Serum erkennen (Tab. 2). Das Serum ist 30 min. nach Injektion von ^{3}H-Cyclophosphamid bei Ratten i.p. entnommen, enteiweißt, neutralisiert und mit Dichlormethan ausgeschüttelt worden.

Die beiden Metabolite Rf 0.86 und Rf 0.73 lassen sich aus Serum oder aus einem Leberschnittinkubat von Cyclophosphamid durch folgende Aufarbeitung (Abb. 2) anreichern :
Zunächst wird ein Leberschnittinkubat nach der Extraktion mit Dichlormethan mit Amylalkohol bei pH 3.5 ausgeschüttelt. Die gesuchten Metabolite gehen dabei in die organische Phase über, während alle übrigen Metabolite mit papierchromatographischen Rf-Werten kleiner als Rf 0.73 in der wässrigen Phase zurückbleiben (Abb. 3). Aus dem Amylalkohol können die beiden Metabolite Rf 0.86 und Rf 0.73 durch Extraktion mit einer Natriumbicarbonat-Lösung wieder in eine wässrige Phase überführt werden.

Vergleicht man die Verteilung der Radioaktivität mit der Verteilung der alkylierenden Aktivität in den einzelnen Schritten dieses Extraktionsverfahrens (Tab. 3), so findet man im Bicarbonat-Extrakt 5.5 % der

Fraktion	Elutions-volumen ml	^{3}H-Aktivität % *	Identifiziert als Rf **
H_2O-Vorlauf		49.2	
S 1	20	3.1	
S 2	30	6.8	
S 3	35	2.6	
S 4	40	1.6	0.60
S 5	60	8.5	0.73
S 6	80	25.6	0.86
S 7	130	2.6	

Tab. 2:

Relative Verteilung der Radioaktivität von Cyclophosphamid-Metaboliten im Serum nach Anionenaustauscher-Chromatographie.

* prozentuale Radioaktivität der einzelnen Fraktionen bezogen auf die gesamte Radioaktivität des enteiweißten Serums nach Extraktion mit Dichlormethan, ermittelt durch Ausplanimetrieren der Gipfel im Ionenaustauscherchromatogramm.

** nachgewiesen im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2).

Serum (Ratte), gewonnen 30 min. nach i. p. -Injektion von ^{3}H-Cyclophosphamid(spezif. Radioaktivität 2.5 μC/mg) 1000 mg/kg.
Bei +4°C Anionenaustauscherchromatographie des neutralisierten Perchlorsäure-Extraktes aus Serum, ausgeschüttelt mit Dichlormethan.
Elutionsgradient: hergestellt aus 50 ml Wasser, 50 ml Wasser und 50 ml 8 N Ameisensäure (s. VI. 4.).

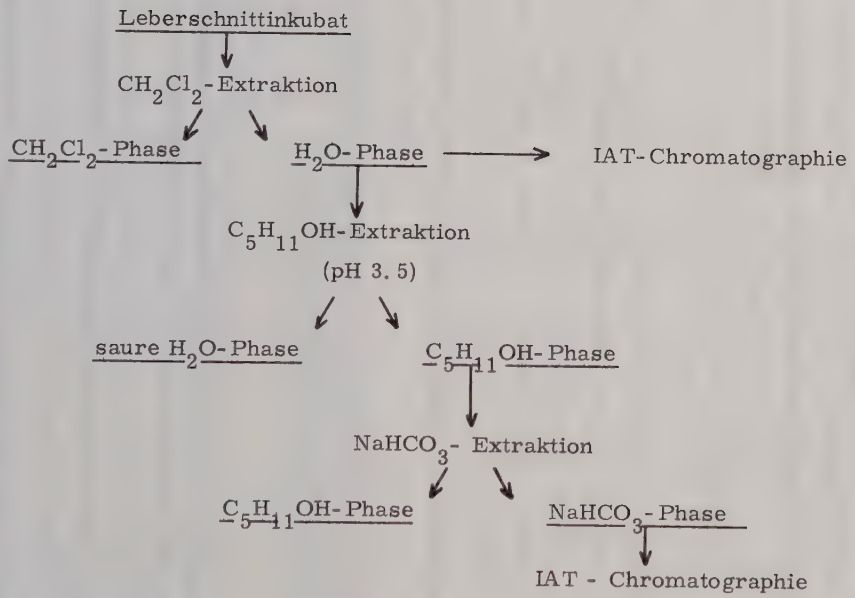


Abb. 2 : Ionenaustauscherchromatographie:

Aufbereitung des enteiweißten, neutralen Leberschnittinkubates

im Inkubat vorhandenen Radioaktivität. Bezogen auf die wässrige Phase nach Ausschütteln des enteiweißten, neutralen Leberschnittinkubates mit Dichlormethan entspricht das 24. 5 % der Radioaktivität. Die alkylierende Aktivität dagegen beträgt im Bicarbonat-Extrakt 45 % der gesamten alkylierenden Aktivität im Inkubat; entsprechend 60 % bezogen auf die wässrige Phase nach Ausschütteln mit Dichlormethan. Die stärkere Anreicherung der alkylierenden Aktivität bei der Extraktion läßt darauf schließen, daß die mit Bicarbonat extrahierbaren Metabolite des Cyclophosphamid die Hauptträger der Alkylierungsfähigkeit sind und somit als die eigentlichen cytostatisch wirksamen Umwandlungsprodukte in vivo anzusehen sind.

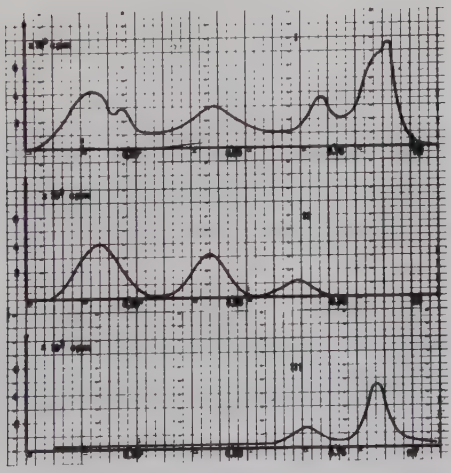


Abb. 3 : Radiopapierchromatogramm eines Leberschnittinkubates von Cyclophosphamid.

I neutralisierter Perchlorsäureextrakt des Inkubates, ausgeschüttelt mit Dichlormethan.

II wässrige Phase nach Extraktion von I mit Amylalkohol bei pH 3. 5.

III organische Phase nach Extraktion von I mit Amylalkohol bei pH 3. 5.

Leberschnitte (Ratte), 60 min. Inkubation in Ringer-Lösung mit (1 mg/ml) ^{3}H-Cyclophosphamid(spezifische Radioaktivität 250 μC/mg).

Aufbereitung	^{3}H-Aktivität		NBP-Aktivität	
	x10^6 dpm	%	µMol	%
Perchlorsäure-Extrakt	2140	100.0	13.8	100.0
H_2O-Phase (nach CH_2Cl_2-Extraktion)	479	22.4	10.4	75.0
$C_5H_{11}OH$-Phase (pH 3.5)	256	12.0	6.8	49.0
$NaHCO_3$-Extrakt	128	5.5	6.2	45.0

Tab. 3:
Verteilung der Radioaktivität und der alkylierenden Aktivität von Cyclophosphamid-Metaboliten bei der Extraktion mit Dichlormethan und Bicarbonat (vgl. Abb. 2).

Leberschnitte (Ratte), 60 min. Inkubation in Ringer-Lösung mit 50 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (spezif. Radioaktivität 250 µC/mg). Neutralisierter Perchlorsäure-Extrakt des Leberschnittinkubates, ausgeschüttelt mit Dichlormethan, Amylalkohol und Natriumbicarbonat. Quantitative Bestimmung der Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler und der alkylierenden Aktivität (NBP-Aktivität) im Test mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin.

Im Anionenaustauscherchromatogramm der Bicarbonat-Phase eines Leberschnittinkubates von ^{3}H-Cyclophosphamid nach der Extraktion mit Dichlormethan, Amylalkohol und Bicarbonat (Abb. 4) treten außer dem radioaktiven Wasservorlauf bei der Elution mit Ameisensäure steigender Konzentration nur vier radioaktive Fraktionen, $S_B 1$ bis S_B 4, auf, während bei der Chromatographie des Inkubates vor der Extraktion (vgl. Abb 1) sieben Fraktionen zu erkennen waren.

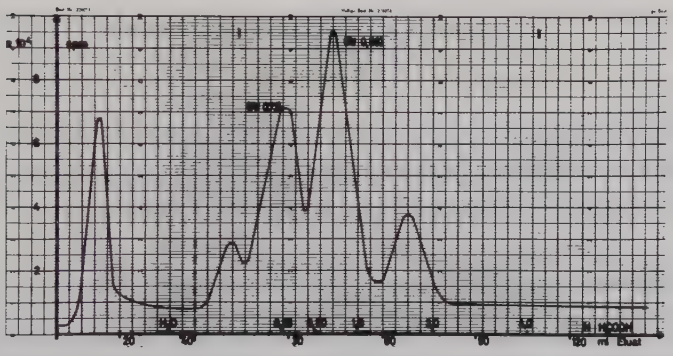


Abb. 4: Anionenaustauscherchromatogramm eines Leberschnittinkubates von Cyclophosphamid nach Ausschütteln des neutralisierten Perchlorsäureextraktes mit Dichlormethan, Amylalkohol und Natriumbicarbonat.

Leberschnitte (Ratte); 60 min. Inkubation in Ringer-Lösung mit 50 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (spezifische Radioaktivität 250 μC/mg).

Die Verteilung der Radioaktivität auf den Wasservorlauf und die vier mit dem Gradienten eluierbaren Fraktionen (Tab. 4) zeigt, daß die Radioaktivität zu insgesamt 70 % auf die Fraktionen $S_B 2$ und

Fraktion	Elutions-volumen ml	^{3}H-Aktivität % *	Identifiziert als Rf **
H_2O-Vorlauf		13.3	
S_B1	15	7.0	
S_B2	30	29.6	0.73
S_B3	45	39.3	0.86
S_B4	70	10.8	

Tab. 4:

Relative Verteilung der Radioaktivität von Cyclophosphamid-Metaboliten im Anionenaustauscher-Chromatogramm eines Leberschnittinkubates nach Extraktion mit Dichlormethan, Amylalkohol und Bicarbonat.

Mittelwerte aus 10 Versuchen

* prozentuale Radioaktivität der einzelnen Fraktionen bezogen auf die gesamte Radioaktivität des Inkubates nach Extraktion mit Dichlormethan, Amylalkohol und Natriumbicarbonat, ermittelt durch Ausplanimetrieren der Gipfel im Ionenaustauscherchromatogramm (vgl. Abb. 4).

** nachgewiesen im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2).

Leberschnitte (Ratte), 60 min. Inkubation in Ringer-Lösung mit 50 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (spezif. Radioaktivität 250 μC/mg).

Bei +4°C Anionenaustauscherchromatographie des neutralisierten Perchlorsäure-Extraktes des Leberschnittinkubates, ausgeschüttelt mit Dichlormethan, Amylalkohol und Natriumbicarbonat.

Elutionsgradient : hergestellt aus 50 ml Wasser, 50 ml Wasser und 50 ml 8 N Ameisensäure (s. VI. 4.).

S_B 3, denen im Papierchromatogramm die Rf-Werte 0.73 und 0.86 zugeordnet werden können, entfällt.
Um für eine Analyse ausreichende Mengen der isolierten Fraktion mit dem Rf-Wert 0.86 zu erhalten, wurden in einem Ansatz 500 mg Cyclophosphamid - wie oben beschrieben - inkubiert und an einer 3 x 60 cm großen Anionenaustauschersäule chromatographisch aufgetrennt. Nach Gefriertrocknen der Fraktion S 6 - Rf 0.86 - verblieben 13 mg eines hygroskopischen, leicht gelb gefärbten Rückstands. Die Ausbeute betrug 2.6 Gewichtsprozent des eingesetzten Cyclophosphamid. Eine Elementaranalyse ergab für Kohlenstoff 27.4 %, für Wasserstoff 4.64 % und für Stickstoff 5.86 %. Die Analysenwerte sind in Tab. 5 zusammengestellt. Eine Bestimmung der übrigen Elemente konnte bei der geringen Substanzmenge nicht durchgeführt werden. Außerdem schien es nicht möglich, den Metaboliten (Rf 0.86) aus mehreren Ansätzen zu sammeln und somit anzureichern, da er sich selbst beim Aufbewahren unter $0^{o}C$ sehr leicht unter Bildung einer Substanz mit dem Rf-Wert 0.73 zersetzt.

Im Infrarot-Spektrum des aus Fraktion S 6 isolierten Metaboliten (Abb. 5) zeigen sich außer einer C = O-Schwingung bei 1700 cm^{-1} zwei Banden bei 1628 und 1400 cm^{-1}, die der ionisierten Carboxyl-Gruppe zugeordnet werden könnten. Eine für P-OH charakteristische Schwingung im Bereich von 2560 bis 2700 cm^{-1} ließ sich nicht nachweisen (8).

Zur weiteren Strukturaufklärung des Cyclophosphamid-Metaboliten (Rf 0.86) soll die biologische Umwandlung von ^{3}H-Cyclophosphamid [VII], welches in der N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-Gruppe markiert ist (37), mit der von ringmarkiertem ^{14}C-Cyclophosphamid [VIII] (34) verglichen werden.

	gefunden	berechnet *
C	27.4 %	28.69 %
H	4.7 %	5.16 %
N	5.9 %	9.56 %
N : P **	2.28 : 1	2 : 1
Cl : P **	2.25 : 1	2 : 1

Tab. 5:
Analytische Daten des Metaboliten Rf 0.86

* berechnet als N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester, freie Säure, MG 293, 1 [IX].

** Atomverhältnisse nach Hohorst et al. (24).

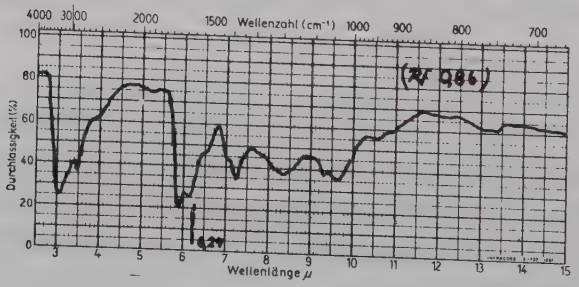
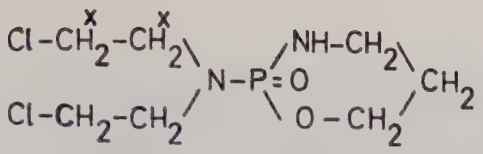
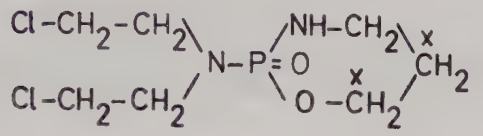


Abb. 5 : IR-Spektrum des Metaboliten Rf 0.86.
Isoliert aus der Fraktion S 6 nach Anionenaustauscherchromatographie eines Leberschnittinkubates. KBr-Preßling (1 mg/300 mg).

VII



VIII

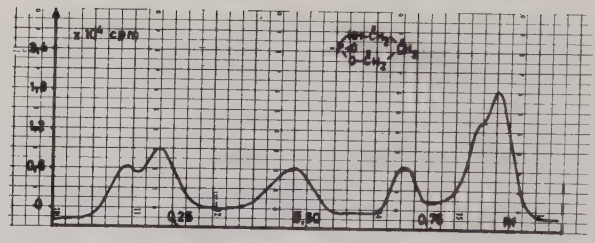


Hierzu werden in parallelen Ansätzen einmal ^{3}H-Cyclophosphamid (spezifische Radioaktivität 250 μC/mg) und zum anderen ^{14}C-Cyclophosphamid (spezifische Radioaktivität 6 μC/mg) mit Leberschnitten 60 min. bei 37^{o}C in Gegenwart von Sauerstoff inkubiert und die enteiweißten und neutralisierten Inkubate mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Papierchromatographie der wässrigen Phasen im System Butanol/Eisessig/Wasser bei + 4 ^{o} C erfolgt die Auswertung der Chromatogramme im Radioscanner (Abb. 6).

In beiden Papierchromatogrammen erscheinen 5 verschiedene Gipfel bei identischen Rf-Werten. Hieraus muß man schließen, daß sowohl aus dem in der N,N-(Bis-[chlor-äthyl])-phosphamid-Gruppe markierten als auch aus dem ringmarkierten Cyclophosphamid in der Rattenleber die gleichen Metabolite gebildet werden, ohne daß dabei ein Metabolit auftritt, bei dem eine der beiden Gruppen abgespalten ist. Die quantitative Auswertung beider Chromatogramme zeigt Tab. 6. Durch Ansprühen der Papierchromatogramme mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin-Reagens kann man nachweisen, daß nur die Metabolite Rf 0.86 und 0.73 alkylierend wirken.

Das stimmt mit früheren Ergebnissen (24) überein, wonach papierchromatographisch mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin nur diese Rf-Werte gefunden wurden , wenn man zuvor das bei Rf 0.60 auftretende Nor-N-Lost mit Dichlormethan extrahiert.

a)



b)

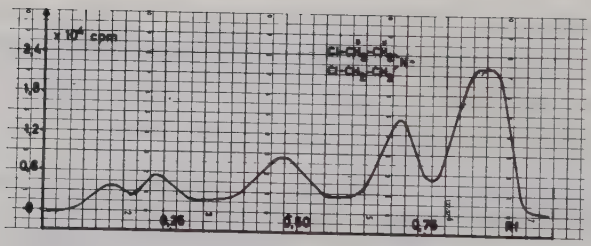


Abb. 6: Radiopapierchromatogramm eines Leberschnittinkubates von Cyclophosphamid. Neutralisierter Perchlorsäureextrakt ausgeschüttelt mit Dichlormethan.

a). Inkubation mit ^{14}C-Cyclophosphamid (spezifische Radioaktivität 6 μC/mg).

b). Inkubation mit ^{3}H-Cyclophosphamid (spezifische Radioaktivität 250 μC/mg).

Herkunft	Verteilung der Radioaktivität in % bei				
	Rf 0.86	0.73	0.45	0.29	0.11
^{3}H-Cyclophosphamid	65.2	15.5	8.1	5.9	5.7
^{14}C-Cyclophosphamid	50.4	8.0	18.5	11.3	12.7

Tab. 6:
Relative Verteilung der radioaktiv-markierten Metabolite von Cyclophosphamid im Papierchromatogramm nach Leberschnittinkubation.

Leberschnitte (Ratte), 60 min. inkubiert in Ringer-Lösung mit (1 mg/ml) ^{3}H-Cyclophosphamid (spezif. Radioaktivität 250 μC/mg) bzw. ^{14}C-Cyclophosphamid (spezif. Radioaktivität 6 μC/mg).
Papierchromatographie des neutralisierten Perchlorsäure-Extraktes des Leberschnittinkubates nach Extraktion mit Dichlormethan, absteigend im System Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2) bei +4°C. Auswertung im Radiochromatogrammscanner.
Quantitative Auswertung durch Ausplanimetrieren der Peaks; prozentuale Radioaktivität bezogen auf die gesamte Radioaktivität der wässrigen Phase nach Extraktion mit Dichlormethan.
Mittelwerte aus 4 Versuchen.

Die quantitative Verteilung der alkylierenden Aktivität auf Rf 0.86 und 0.73 beträgt danach - korrigiert auf die eingesetzte wässrige Phase nach Ausschütteln des mit Dichlormethan extrahierbaren Anteils - 71 % an Rf 0.86 und 29 % an Rf 0.73.

Über die Struktur des Metaboliten (Rf 0.86) läßt sich an Hand der beschriebenen Eigenschaften, der Analysendaten und nach früheren Befunden folgendes aussagen:

1). Der Metabolit entsteht in vivo durch mikrosomale Oxydation und nicht durch Hydrolyse von Cyclophosphamid (13).

2). Da der Metabolit alkylierend wirkt, wie im Test mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin nachgewiesen werden kann, muß die Bis-(2-chloräthyl)-Gruppierung noch vorhanden sein.

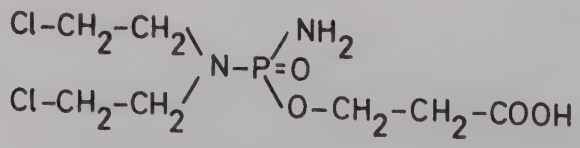
3). Der Metabolit enthält außerdem Phosphor, da er im Papierchromatogramm auch mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagens angefärbt werden kann.

4). Nach den Analysendaten sind ein Atom Phosphor und je zwei Atome Stickstoff und Chlor pro Molekül des Metaboliten vorhanden (24).

5). Die Propyl-Gruppe des N',O-Propylen-Ringes im Cyclophosphamid wird nicht abgespalten, da im Radiochromatogramm nach Inkubation von Cyclophosphamid, welches in der Bis-(2-chlor-äthyl)-Gruppe markiert ist, oder von ringmarkiertem Cyclophosphamid stets der Metabolit Rf 0.86 nachweisbar ist.

6). Im Infrarot-Spektrum des Metaboliten ist eine Carboxyl-Funktion zu erkennen, außerdem die für P-N und P-O-C charakteristische Schwingung, während eine P-OH-Bande nicht gefunden wurde.

Daraus läßt sich für den Metaboliten Rf 0.86 zunächst folgende mögliche Struktur diskutieren:



IX

Die aus Materialmangel notwendigerweise unvollständige Elementaranalyse brachte keine endgültige Bestätigung für diese Annahme. Deshalb waren weitere Versuche erforderlich, um die Struktur [IX] des Metaboliten (Rf 0.86) zu beweisen.

II. 2. Oxydation von Cyclophosphamid durch Modell-Enzym-Systeme

RAUEN und NORPOTH (30) fanden bei der Oxydation von Cyclophosphamid mit Hilfe eines von UDENFRIEND (38) beschriebenen "Hydroxylase-Modell-Systems" im Papierchromatogramm und im Elektropherogramm die gleichen Rf-Werte und Wanderungsstrecken wie nach der biologischen "Aktivierung" von Cyclophosphamid im Rattenblut. Daraus schlossen sie, daß bei der mit diesem Enzymmodell durchgeführten Oxydation von Cyclophosphamid die gleichen Metabolite entstehen, die auch bei der Umwandlung von Cyclophosphamid in vivo gebildet werden.

Diese Befunde konnten von uns bestätigt werden, da wir papierchromatographisch nach der "Aktivierung" von Cyclophosphamid im Udenfriend-System ebenso wie im Leberschnittinkubat bei den Rf-Werten 0.86 und 0.73 durch Ansprühen mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin alkylierende Substanzen nachweisen konnten. Daher hofften wir mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie den Metabolit (Rf 0.86) nach der Oxydation des Cyclophosphamid in größeren Mengen isolieren zu können. 50 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (spezifische Radioaktivität 250 μC/mg) werden über 5 Stunden bei 37^{o}C unter ständigem Durchperlen mit Sauerstoff in Udenfriend-Lösung * inkubiert und mit Dichlor-

---

* Zusammensetzung: 102.2 mg Ascorbinsäure
21.2 mg Eisen-II-sulfat
89.4 mg Titriplex III
mit 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.0
auf 100 ml aufgefüllt.

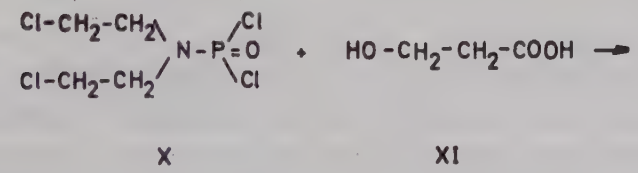
methan ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird wie oben beschrieben an Dowex 2 x 8 chromatographiert. Dabei können nur 11 % der Radioaktivität der wässrigen Phase am Anionenaustauscher adsorbiert werden, die restlichen 89 % befinden sich im Wasservorlauf. und entsprechen Verbindungen mit papierchromatographischen Rf-Werten kleiner als 0.70.

Durch Elution mit einem Ameisensäuregradienten erhält man fünf radioaktive Fraktionen. Auf die Fraktion 4, der der Rf-Wert 0.86 im Papierchromatogramm zugeordnet werden kann, entfallen nur 2.3 % der eingesetzten Radioaktivität, d.h. der größte Teil des Cyclophosphamid wird im Udenfriend-System zu anderen Metaboliten umgewandelt, so daß es nicht gelingt, den Metaboliten (Rf 0.86) durch Anionenaustauscherchromatographie in größeren Konzentrationen abzutrennen als nach der Leberschnittaktivierung von Cyclophosphamid, bei der unter gleichen Bedingungen die zehnfache Menge isoliert werden kann.

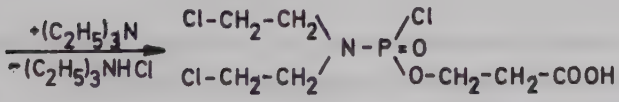
III. Synthese

Nach den im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Methoden war es nicht möglich, von dem ersten faßbaren cytostatisch aktiven Metaboliten (Rf 0.86) des Cyclophosphamid nach biologischer Aktivierung oder durch chemische Oxydation mit einem Enzym-Modell mehr als ca. 20 mg zu isolieren und eine vollständige Elementaranalyse durchzuführen. Daher wurde der Versuch unternommen, die Struktur [IX] dieses Metaboliten durch Synthese zu bestätigen oder auszuschließen. Der eingeschlagene Syntheseweg verläuft, unter Vermeidung von Hydrolyseschritten, in einer Reaktionsfolge über zwei Stufen :

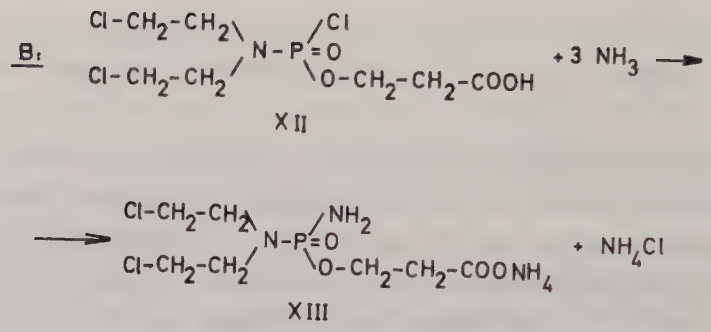
A:



X XI



XII



III. 1. N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäureamid-chlorid-ester [XII]

1 Mol N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid [X] wird bei Zimmertemperatur in stark verdünnter benzolischer Lösung mit 1 Mol 3-Hydroxy-propionsäure [XI] umgesetzt. Dabei ist die Anwesenheit von 1 Mol Triäthylamin erforderlich, um den freiwerdenden Chlorwasserstoff als Triäthylammoniumchlorid abzufangen. Nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen Triäthylammoniumchlorids und nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels verbleibt ein öliger Rückstand, der durch Extraktion mit Äther von den nicht umgesetzten Ausgangsverbindungen befreit wird.

Um mögliche Nebenreaktionen in der Reaktionsstufe A zu unterdrücken, werden die Ausgangsverbindungen zunächst gereinigt:

a). N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid [X] dargestellt nach FRIEDMAN und SELIGMAN (17), zersetzt sich teilweise bei 4 ^{o} C innerhalb einer Woche. Dabei wird N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-amin, (Nor-N-Lost), [II] freigesetzt, welches unter den obigen Reaktionsbedingungen mit unverändertem [X] zu dem entsprechenden Diamid reagiert. Durch Umkristalli-

sation erhält man reines Phosphamid-dichlorid. Es ist papierchromatographisch einheitlich, Rf 0. 94 im System Butanol/Eisessig/Wasser, und zeigt keine Verunreinigungen an Nor-N-Lost bei Rf 0. 60.

b). 3-Hydroxy-propionsäure [XI], käuflich als sirupöse Flüssigkeit, enthält bis zu 40 % Wasser. Um einen möglichst niedrigen Wassergehalt zu erreichen, extrahiert man die 3-Hydroxypropionsäure 3 mal mit Äther und trocknet die Ätherphase über Natriumsulfat.

Die höchste Ausbeute der Reaktion A erzielt man durch die Verwendung von wasserfreiem Benzol als Lösungsmittel. Sie liegt, berechnet sowohl auf die Menge des gebildeten Triäthylammoniumchlorid als auch auf den Gehalt an alkylierender Aktivität im Öl [XII], bei 85 %. Benutzt man dagegen wasserfreien Äther als Lösungsmittel, so liegen die Ausbeuten um 20 - 30 % niedriger. In diesem Lösungsmittel fällt [XII] zusammen mit dem Triäthylammoniumchlorid aus, kann dann aus dem Niederschlag mit Aceton ausgezogen werden und bleibt nach dem Entfernen des Aceton ebenfalls als Öl zurück.

Setzt man bei der Reaktion A in Benzol, 1 Mol Wasser pro Mol Ausgangsverbindung zu, bleibt die Auswaage an Triäthylammoniumchlorid gleich; der Gehalt an alkylierender Aktivität im Öl [XII] fällt dagegen auf die Hälfte ab. Man muß also annehmen, daß der Zusatz von Wasser zu einer Abspaltung von Chlorid-Ionen aus der 2-Chlor-äthyl-Funktion entweder des Ausgangs- oder des Endprodukts führt, da diese für die Alkylierungsfähigkeit verantwortlich sind (vgl. (19)).

III. 2. N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl])-phosphorsäurediamid-ester [XIII]

Da die Zwischenstufe [XII] aus dem öligen Rückstand nicht in reiner Form isoliert werden kann, wird sie unmittelbar in Äthylacetat als Lösungsmittel mit gasförmigem, trockenem Ammoniak bei 0^{o} C zu [XIII] umgesetzt. Das ausgefällte Ammoniumchlorid und das Lösungsmittel werden abgetrennt. Es verbleibt wiederum ein gelber öliger Rückstand, der nicht kristallisiert.

Beide Öle [XII] und [X III] unterscheiden sich deutlich durch ihre Löslichkeit und ihr papierchromatographisches Verhalten :

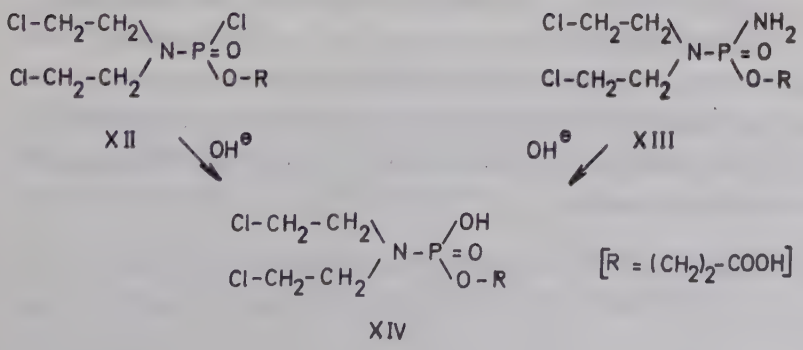
Das Produkt [XII] ist schwer wasserlöslich; der Rf-Wert im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser, beträgt 0. 92 . Suspendiert man das Öl länger als 2 Std. bei 25 ^{o} C in Wasser, verschiebt sich der Rf-Wert von 0. 92 nach 0. 73.

Das Öl [XIII] ist dagegen sehr gut in Wasser löslich. Der Rf-Wert liegt bei 0. 86. Auch hier tritt nach längerer Zeit (24 Std, 25^{o}C) in wässriger Lösung eine Verschiebung des Rf-Wertes von 0. 86 nach 0. 73 ein.

Für die Reaktion B zeigen sich hinsichtlich der Ausbeute keine Unterschiede bei der Verwendung verschiedener Lösungsmittel (Aceton, Äthylacetat, Benzol oder Methyläthylketon). Lediglich die Dauer der Aminierung und die Reaktionstemperatur beeinflussen die Bildung von [XIII]. Leitet man länger als eine Stunde bei 0^{0} C oder bei höherer Temperatur Ammoniak ein, findet man im Papierchromatogramm neben dem Rf-Wert 0. 86 mit zunehmendem Maße eine Verbindung mit dem Rf-Wert 0. 73.

Die Farbintensität bei Rf 0. 73 nimmt dabei im Laufe von zwei Stunden weiter zu, während die Farbintensität bei Rf 0. 86 abnimmt. Die Summe der alkylierenden Aktivität des Öles [XIII] bleibt während des untersuchten Zeitraumes bis zu zwei Stunden bei einer Abweichung von $\pm$ 10 % konstant.

Das Auftreten des Rf-Wertes 0. 73 aus den Ölen [XII] und [XIII] stimmt mit dem Rf-Wert einer Verbindung überein, die auch bei der biologischen Aktivierung von Cyclophosphamid gebildet wird (vgl. Teil II. 1.). Sie konnte bisher allerdings nicht in Substanz gewonnen werden, so daß nur indirekt auf ihre Struktur geschlossen werden kann : Die Verbindung Rf 0. 73 gibt im Papierchromatogramm sowohl mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin-Spray als auch mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagens eine Farbreaktion, d. h. die N, N-(Bis-[2-chloräthyl])-phosphamid-Bindung ist noch erhalten. Da weiterhin die Größe des Alkylierungspotentials nicht abnimmt, muß man folgern, daß keines der beiden Chloratome der N-Lost-Funktion abgespalten ist. Und wie Einbauversuche mit Tritium in der 2-Carboxy-äthyl-Gruppe zeigen (vgl. Teil IV), bleibt auch die Phosphorsäureester-Bindung erhalten. Nach diesen Befunden ist es wahrscheinlich, daß die Verbindung mit dem Rf-Wert 0. 73 durch eine alkalische Hydrolyse entsteht, die entweder von der Zwischenstufe [XII] oder von dem Endprodukt [XIII] zu [XIV] führen kann :



III. 3. Derivate des N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl])-phosphorsäurediamid-ester [XIII]

Aus dem in der Reaktionsstufe B gebildeten Öl [XIII] lassen sich verschiedene feste, z. T. kristalline Derivate isolieren. Alle Derivate besitzen im Papierchromatogramm, System Butanol/ Eisessig/Wasser, einen Rf-Wert von 0. 86, nachgewiesen mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin und Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagens.

III. 3. 1. Lithium-, Natrium- und Kalium-Salz [XIII]

Eine wässrige Lösung des Öles [XIII] kann man über einen Kationenaustauscher umsalzen. Je nach dessen Beladungsform erhält man aus dem Eluat nach Gefriertrocknen der Fraktionen, die alkylierende Aktivität zeigen, das entsprechende Lithium-, Natrium- oder Kalium-Salz von [XIII]. Dabei treten keine Adsorptionseffekte auf, die zu einer Abtrennung von der fast stets vorhandenen Verunreinigung, charakterisiert durch den Rf-Wert 0. 73, führen. Sowohl das Natrium- als auch das Kalium-Salz sind stark hygroskopisch : beide zerfließen an der Luft sehr schnell und sind infolgedessen schlecht zu handhaben. Dagegen kann das Lithium-Salz in trockener, amorpher Form gewonnen werden. Die Reinheit beträgt dabei 79 %, bezogen auf die alkylierende Aktivität pro mg Substanz; sie wird bis auf 90 % gesteigert (Tab. 7), wenn man das Lithium-Salz über Cellulose-Pulver mit absolutem Äthanol als Elutionsmittel chromatographiert. Die Verunreinigung mit der Substanz (Rf 0. 73) wird dabei allerdings nicht vollständig beseitigt.

III. 3. 2. Calcium- und Barium-Salz [XIII]

Auf Zusatz von Calciumchlorid oder Calciumnitrat zu einer auf pH 4. 5 angesäuerten wässrigen Lösung des Öles [XIII], fällt ein amorpher Niederschlag aus. Dieses Calciumsalz von [XIII] ist in Aceton oder in Äthanol sehr gut löslich. Die Reinheit erreicht auch hier nach Adsorptionschromatographie über Cellulose mit Äthanol höchstens 94 %, beurteilt nach der alkylierenden Aktivität pro mg Substanz (Tab. 7).
Im Papierchromatogramm des frisch gefällten Calciumsalzes ist neben Rf 0. 86 keine alkylierungsfähige Substanz bei Rf 0. 73 nachzuweisen, selbst wenn in der Ausgangslösung vor der Fällung mit Calcium-Ionen bis zu 50 % von dieser Verbindung vorhanden waren. Das Calcium-Salz mit Rf 0. 86 [XIII] muß demnach wesentlich schwerer wasserlöslich sein als das Calciumsalz von [XIV], da keine Verbindung mit dem Rf 0. 73 mit ausgefällt werden kann. Läßt man allerdings ein Calcium-Salz, Rf 0. 86, ein bis zwei Tage bei Zimmertemperatur stehen, findet man bei erneuter papierchromatographischer Überprüfung alkylierende Aktivität auch bei Rf 0. 73, wahrscheinlich infolge einer allmählichen Hydrolyse des Salzes der Verbindung [XIII] zu [XIV].

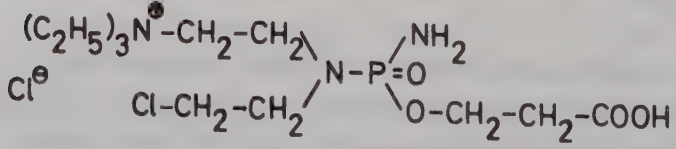
Bei der papierchromatographischen Untersuchung eines frischen Calcium-Salzes [XIII] tritt beim Anfärben mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Spray neben dem Rf-Wert 0. 86 ein neuer Rf-Wert von 0. 2 hervor, der vor der Calciumfällung nicht beobachtet wird. Die Substanz, die durch diesen Rf-Wert charakterisiert wird, enthält Phosphor, wirkt aber nicht alkylierend. Sie wird bei der Fällung angereichert, so daß sie erst beim Calcium-Salz als sichtbare Verunreinigung in Erscheinung tritt.

Durch eine Fällung von [XIII] mit Bariumnitrat oder Bariumchlorid aus wässriger Lösung erhält man nadelförmige Kristalle des

Barium-Salzes von [XIII]. Es ist ebenfalls in Aceton sehr gut löslich, im Gegensatz zum Calcium-Salz aber auch stärker wasserlöslich. Daher liegen die Ausbeuten bei der Fällung niedriger. Bezüglich der Reinheit zeigen Calcium- und Barium-Salz [XIII] keinen Unterschied (Tab. 7).

III. 3. 3. Umsetzung von [XIII] mit Triäthylamin

Es wurde versucht, die Verbindung [XIII] als Triäthylammonium-Salz aus einer Lösung des Öles [XIII] in Aceton durch Zugabe einer äquivalenten Menge an Triäthylamin auszufällen. Man erhält dabei ein kristallines Produkt mit dem Rf-Wert 0.88 im Papierchromatogramm. Da der NBP-Titer, als Maß für die Größe der Alkylierungsfähigkeit, jedoch nur maximal 50 % der Theorie beträgt (Tab. 7), muß ein Chlor-Atom der Bis-(2-chloräthyl)-Funktion in Reaktion getreten sein. Es handelt sich demnach bei den gewonnenen Kristallen nicht um ein Salz des Phosphorsäurediamid-esters [XIII], sondern wahrscheinlich um ein Alkylierungsprodukt gemäß folgender Formel:



XV

Da die Summenformel für das Alkylierungsprodukt und für das Salz die gleiche ist, sind in der Elementaranalyse keine Unterschiede zu erwarten. Das Infrarot-Spektrum der Verbindung [XV] ist in Abb. 12 abgebildet.

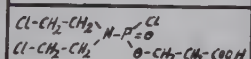
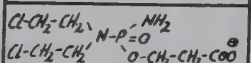
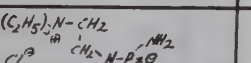
III. 3. 4. Analytische Daten.

In der Tab. 7 sind die durch Elementaranalyse ermittelten Werte für die Öle und Derivate den theoretisch zu erwartenden Werten gegenübergestellt. Die einzelnen Bestimmungen weichen zum Teil über die normale Fehlergrenze der Methode hinaus von der Theorie ab, da die dargestellten Substanzen, mit Ausnahme des Alkylierungsproduktes [XV], welches aus Dichlormethan umkristallisiert ist, weder durch Destillation noch durch Umkristallisieren vollständig gereinigt werden können. Der fast immer auftretende zu niedrige Stickstoffgehalt läßt sich außerdem durch die stets vorhandene Verunreinigung des Phosphorsäurediamidesters [XIII] (Rf 0. 86) und seiner Derivate durch die Verbindung [XV] (Rf 0. 73) auf Grund der leichten Hydrolysierbarkeit erklären.

Die Infrarot-Spektren der gewonnenen Verbindungen und Derivate in Abb. 7 bis 12 zeigen die charakteristische C = O-Schwingung bei 1725 - 1700 cm^{-1} und die Phosphorsäureester-Schwingung bei 1050 bis 990 cm^{-1} (8) ebenso wie das Spektrum des im Teil II beschriebenen Metaboliten (vgl. Abb. 5). Zusammen mit den Analysendaten bestätig en die Spektren die Struktur der nach der Reaktion A und B dargestellten Substanzen.

III. 4. Radioaktive Synthese

Als weiteres Kriterium für den Verlauf der Synthese in der gewünschten Richtung und zum genauen Vergleich des Metaboliten (Rf 0. 86) mit dem Syntheseprodukt [XIII] wurde durch Umsetzung von radioaktiven Ausgangssubstanzen dieses Produkt als markierte Verbindung hergestellt.

Substanz	Elementaranalyse in % C	H	N	P	Cl	Ca		NBP-Titer x 10^{-6} Mol/mg	Molekular-gewicht	Fp. in °C
 [XII]	26.67	4.82	4.79	9.38	33.86		gef.	3.06	312.5	(Öl)
	26.86	4.15	4.47	9.89	33.98		theor.	3.21		
 [XIII]	27.09	5.52	11.77	9,55	23.48		gef.	3.14	310.1	(Öl)
	27.12	5.85	13.55	9.99	22.87		theor.	3.23		
Li-Salz [XIII]	27.6	5.0	8.6	10.52	23.89		gef.	3.00	299.0	147 - 9
	28.12	4.72	9.37	10.38	23.72		theor.	3.35		
K-Salz [XIII]	25.47	3.89	7.17	10.44	20.36		gef.	2.70	331.2	220
	25.39	4.26	8.46	9.39	21.41		theor.	3.02		
Ca-Salz [XIII]	26.5	4.5	7.0	9,48	23.23	6.9	gef.	3.02	624.3	>260
	26.98	4.52	8.98	9.92	22.72	6.5	theor.	3.21		
Ba-Salz [XIII]	22.95	3.45	7.52	8.54	20.42		gef.	2.52	721.5	>220
	23.29	3.91	7.76	8.59	19.68		theor.	2.78		
 [XV]	39.68	7.97	9.83	7.00	16.80		gef.	1.25	394.3	142
	39.63	7.68	10.67	7.88	17.98		theor.	2.54		

Tab. 7 :

Analytische Daten der Syntheseprodukte

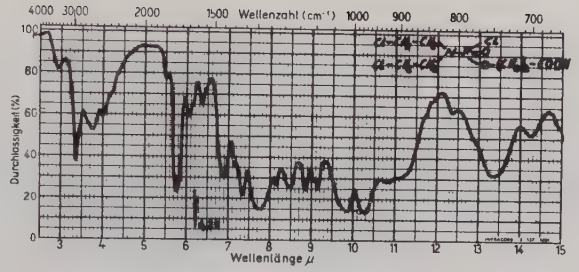


Abb. 7 : IR-Spektrum des Öles [XII].
N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäureamid-chlorid-ester.

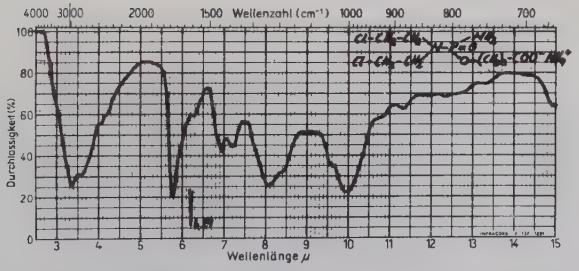


Abb. 8 : IR-Spektrum des Öles [XIII].
N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester.

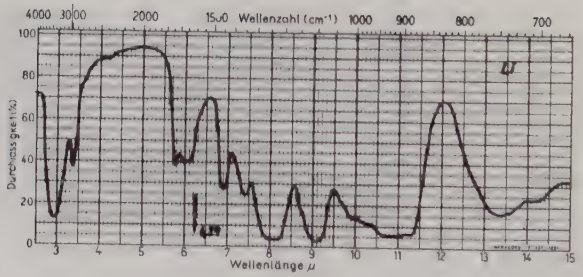


Abb. 9 : IR-Spektrum des Lithium-Salzes [XIII].

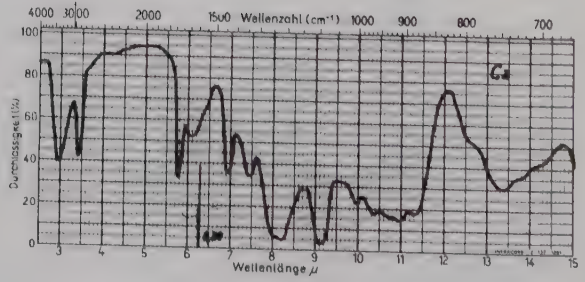


Abb. 10 : IR-Spektrum des Calcium-Salzes [XIII].

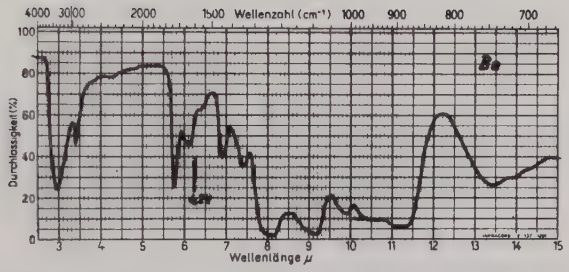


Abb. 11 : IR-Spektrum des Barium - Salzes [XIII].

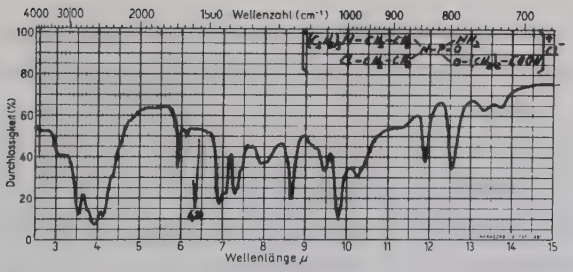
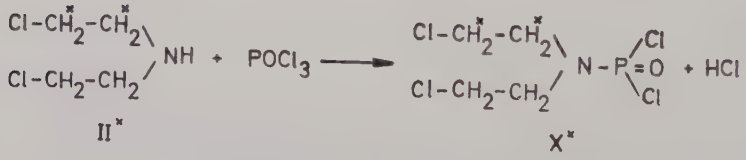


Abb. 12 : IR-Spektrum des Alkylierungsproduktes [XV].

Zwei Stellen des Moleküls [XIII] sind dabei von besonderem Interesse. Einmal der N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-Rest und zum anderen der O-(2-Carboxy-äthyl)-Rest.

III. 4. 1. N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid und N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester

Da keine der beiden Ausgangsverbindungen [X] und [XI] in radioaktiv markierter Form im Handel erhältlich ist, muß zunächst tritiiertes Phosphamid-dichlorid in Analogie zu dem Verfahren für die unmarkierte Verbindung nach FRIEDMAN und SELIGMAN (17) synthetisiert werden.



II* X*

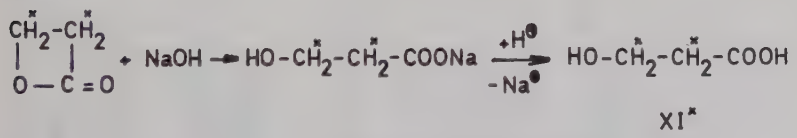
N, N-(Bis-[2-chloräthyl])-amin-hydrochlorid wird mit N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-amin-hydrochlorid vermischt und am Rückfluß mit Phosphoroxid-trichlorid zur Reaktion gebracht. Durch fraktionierte Destillation des Reaktionsgemisches erhält man nach Umkristallisation papierchromatographisch reines, kristallines N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid [X*]. Das so erhaltene tritiierte Phosphamid-dichlorid [X*] wird, wie unter III. 1. und III. 2. beschrieben, mit 3-Hydroxy-propionsäure umgesetzt und nach Aminierung kommt man zu N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester, markiert in der 2-Chlor-äthyl-Gruppe [XIII*].

Die Radioaktivitätsausbeuten in den einzelnen Reaktionsschritten (Tab. 8) stimmen größenordnungsmäßig mit denen überein, die an Hand der Auswaage beziehungsweise des Alkylierungspotentials im Test mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin ermittelt sind. Die spezifische Radioaktivität erreicht mit zunehmender Reinigung nahezu den Wert des eingesetzten Phosphamid-dichlorids [X^*] (Tab. 8). Die Rf-Werte im Radiochromatogramm sind die gleichen wie diejenigen, die durch Ansprühen mit NBP-Reagens gefunden werden.

III. 4. 2. 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure und N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-^{3}H-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester

Zur radioaktiven Etikettierung von [XIII] in der 2-Carboxy-äthyl-Gruppe des Moleküls werden die Reaktionen A und B ausgehend von 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure durchgeführt.

Die benötigte 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure wird durch alkalische Verseifung aus ^{3}H-ß-Propiolacton, das im Handel erhältlich ist, hergestellt.



^{3}H-ß-Propiolacton hydrolysiert man zunächst mit einem Überschuß an Natronlauge bei 100°C und setzt aus dem entstehenden 3-Hydroxy-Natrium-propionat im Eisbad mit der äquivalenten Menge an Schwefelsäure die tritiierte 3-Hydroxy-propionsäure frei. Die Reinigung erfolgt wie im Absatz III. 2. beschrieben.

Substanz	Umsatz *		^{3}H-Ausbeute **		spezifische Radioaktivität	
	g	% d. Theorie	x 10^9 dpm	%	x 10^6 dpm/mg	x 10^9 dpm/mÄqu
Phosphamid-dichlorid[X*]					6.66	1.73
Triäthylamin · HCl	2.2	83.0	0.8	2.5	0.38	0.05
Öl [XII]	5.2	85.0	15.5	47.0	2.98	0.93
Öl [XIII]	3.9	65.0	14.5	44.0	3.72	1.15
Ca-Salz [XIII]	0.5	8.3	2.6	7.8	5.20	1.62

Tab. 8 :

Radioaktive Synthese

Ausgangsverbindung : N,N-(Bis-2-chlor-^{3}H-äthyl)-phosphorsäureamid-dichlorid [X*]

* Umsatz berechnet auf das eingesetzte Phosphamid-dichlorid (5.0 g).

** ^{3}H-Ausbeute berechnet auf die eingesetzte Radioaktivität als Phosphamid-dichlorid (33.3 · 10^9 dpm)

Die radioaktiv-markierte 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure [XI*] wird mit N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid zur Reaktion gebracht (vgl. III. 1.) und nach dem Einleiten von Ammoniak entsteht N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-^{3}H-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester (vgl. III. 2.). Aus Tab. 9 ersieht man die Radioaktivitätsausbeuten und den Umsatz, sowie die spezifische Radioaktivität in den einzelnen Reaktionsstufen, die ebenso wie bei der vorher beschriebenen Synthese mit zunehmender Reinigung ansteigt.

Substanz	Umsatz *		^{3}H-Ausbeute **		spezifische Radioaktivität	
	g	% d. Theorie	x 10^9 dpm	%	x 10^6 dpm/mg	x 10^9 dpm/mÄqu
3-Hydroxy-propionsäure[XI*]					6.18	0.556
Triäthylamin · HCl	2.6	98.0	0.5	4.1	0.19	0.026
Öl [XII]	4.5	73.0	5.8	47.0	1.29	0.403
Öl [XIII]	3.7	62.0	4.9	40.0	1.33	0.412
Ca-Salz [XIII]	0.6	9.4	0.8	6.7	1.34	0.418

Tab. 9 :

Radioaktive Synthese

Ausgangsverbindung : 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure [XI*]

* Umsatz berechnet auf die eingesetzte 3-Hydroxy-propionsäure (1.7 g).

** ^{3}H-Ausbeute berechnet auf die eingesetzte Radioaktivität als 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure (12.2 · 10^9 dpm)

IV. Vergleichende Untersuchungen von biologischem Metabolit (Rf 0.86) aus Cyclophosphamid und Syntheseprodukt [XIII]

Nachdem es gelungen war, den durch Synthese dargestellten N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester an zwei Stellen des Moleküls radioaktiv zu markieren, konnten genauere Vergleiche zwischen dieser Verbindung und dem aus Cyclophosphamid gewonnenen Metaboliten (Rf 0.86) durchgeführt werden.

Im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser, zeigt das Syntheseprodukt [XIII] ebenso wie der Metabolit (Rf 0.86) beim Ansprühen mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin, als Reagens auf alkylierungsfähige Substanzen, und mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagens, als Nachweis für phosphathaltige Verbindungen, einen Rf-Wert von 0.86. Im Radiochromatogramm findet man ebenfalls Rf 0.86. Dabei ist es gleich, ob der Metabolit durch biologische "Aktivierung" von in der (2-Chlor-äthyl)-Gruppe markiertem oder ringmarkiertem Cyclophosphamid gewonnen wird, beziehungsweise ob das Syntheseprodukt [XIII] in der (2-Chlor-äthyl)-Gruppe oder in der O-(2-Carboxy-äthyl)-Gruppe mit Tritium markiert ist.
Führt man die papierchromatographische Trennung in einem von RAUEN (31) beschriebenen System, n-Propanol/Eucalyptol/Ameisensäure im Verhältnis 5 : 5 : 2, absteigend durch, so liegt der Rf-Wert sowohl für biologisches als auch synthetisches Produkt stets bei Rf 0.92.
Ein Vergleich des Metaboliten (Rf 0.86) nach Leberschnittinkubation von ^{3}H-Cyclophosphamid mit N,N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester [XIII] im Hochspannungselektropherogramm ergibt für beide Substanzen die gleiche, sehr geringe Wanderungsgeschwindigkeit. In einem Pyridin-Eisessigpuffer, pH 6.0, beträgt die Laufstrecke zur Anode 1.3 cm/h bei 1500 V, 80 mA und 0 ^{o}C.

Das synthetisch gewonnene Produkt [XIII] kann ebenso wie der Metabolit aus wässriger Lösung bei pH 3.5 mit Amylalkohol ausgeschüttelt und aus der Amylalkoholphase mit Natriumbicarbonat-Lösung reextrahiert werden (vgl. Abb. 2).
Bei dem Versuch, das ölige Produkt [XIII] zunächst durch diese Extraktion und weiter durch Anionenaustauscherchromatographie der Bicarbonat-Phase (vgl. II. 1.) zu reinigen, findet man bei der Elution mit Ameisensäure nur 42 % der aufgegebenen alkylierenden Aktivität im Test mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin wieder.
Der Rest wird am Anionenaustauscher nicht adsorbiert und befindet sich im Wasservorlauf. Papierchromatographisch, im System Butanol/Eisessig/Wasser, sind im Wasservorlauf nur die Rf-Werte 0.60, 0.55 und 0.2 nachweisbar, im Ameisensäure-Eluat Rf 0.86 neben 0.72.
Da das aufgegebene Öl mit dem Rf-Wert 0.86 einheitlich war, muß auf der Säule teilweise Zersetzung eingetreten sein. Der gleiche Befund tritt bei papierchromatographisch einheitlichen Leberschnittinkubaten von Cyclophosphamid auf (s. II. 1.).
Um die Übereinstimmung zwischen Syntheseprodukt [XIII] und dem Cyclophosphamid-Metaboliten deutlicher zu zeigen, werden beide Substanzen auf einer Anionenaustauschersäule gleichzeitig chromatographiert. Dazu wird zunächst ein Leberschnittinkubat von ^{14}C-Cyclophosphamid (ringmarkiert) mit Amylalkohol und Natriumbicarbonat-Lösung extrahiert. Die Bicarbonatphase gibt man gemeinsam mit auf die gleiche Art aufbereitetem N,N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester [XIII] auf eine Säule mit Dowex 2 X 8 auf. Die Radioaktivität im Wasservorlauf und im Eluat des Ameisensäuregradienten kann mit Hilfe eine Durchflußszintillationszelle fortlaufend registriert werden. Die Einstellung der Discriminatoren des 2-Kanal-Szintillationszählers muß dabei so gewählt werden, daß auf Grund der unterschiedlichen Energiespektren beider Isotope im ersten

Kanal Tritium und ^{14}C und im zweiten Kanal nur ^{14}C erfaßt wird. Die Radioaktivität in beiden Meßkanälen läßt sich dann über zwei Ratemeter und einen Zweifachschreiber getrennt aufzeichnen.

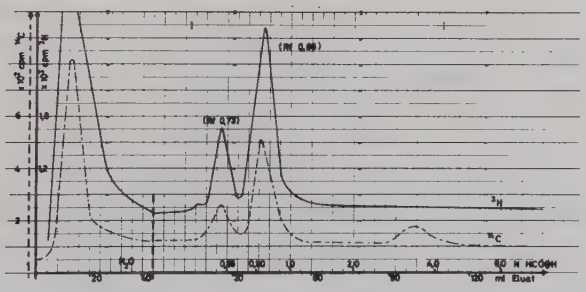


Abb. 13 : Anionenaustauscherchromatogramm von Cyclophosphamid-Metaboliten und N. N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester.

--- Leberschnittinkubat von ^{14}C-Cyclophosphamid, nach Neutralisation des Perchlorsäureextraktes ausgeschüttelt mit Dichlormethan, Amylalkohol und Natriumbicarbonat.

—— öliges Syntheseprodukt[XIII], aus wässriger Lösung ausgeschüttelt mit Amylalkohol und Natriumbicarbonat.

Im Chromatogramm, Abb. 13, sieht man, daß beide Isotope, ^{14}C und ^{3}H, bei den gleichen Elutionsvolumina erscheinen. Das heißt, ein Leberschnittinkubat von ^{14}C-Cyclophosphamid verhält sich unter den gegebenen Bedingungen ebenso wie der synthetisch gewonnene N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester.

Da das biologische Umwandlungsprodukt des Cyclophosphamid, charakterisiert durch den Rf-Wert 0.86, mit dem synthetisierten Produkt [XIII] außerdem papierchromatographisch und hochspannungs-elektrophoretisch übereinstimmt, kann man die Schlußfolgerung ziehen, daß beide die gleiche Struktur besitzen. Somit ist die Formel, die für den Metaboliten (Rf 0.86) an Hand der gewonnenen Analysen-daten diskutiert wurde (vgl. II. 1.), durch die Synthese bestätigt.

V. Diskussion

Die cytostatische Wirkung chlorierter Alkylamine vom Typ des N-Lost beruht auf der leichten Beweglichkeit der zum Stickstoff ß-ständigen Chlor-Atome und der dadurch gegebenen Alkylierungspotenz. Die Effekte in der lebenden Zelle sind wahrscheinlich sehr vielfältig, da die alkylierenden Substanzen mit zahlreichen Zellbausteinen reagieren können (vgl. Übersicht (39)).
Die therapeutische Verwendbarkeit ist jedoch begrenzt, da die meisten N-Lost-Derivate im Bereich wirksamer Dosen auch eine hohe Toxizität besitzen. Neben den malignen Zellen werden ebenso normale Zellen mit hoher Proliferationsrate, wie Darmepithelien, Knochenmark und Haarbälge, vom Cytostaticum angegriffen. Zur Erhöhung der Tumorspezifität wurden im Laufe der letzten fünfzehn Jahre eine Vielzahl von Derivaten des N-Lost auf ihre pharmakologische Bedeutung hin untersucht (6). Bei allen diesen Verbindungen ist durch eine Verminderung der Basizität des Stickstoff-Atoms im Bis-(2-chlor-äthyl)-amin-Rest die Reaktivität der ß-ständigen Chlor-Atome und damit die Alkylierungsfähigkeit herabgesetzt.
Das Cyclophosphamid (ENDOXAN ®), das eine besonders große Spanne zwischen erwünschter therapeutischer und unerwünschter cytotoxischer Wirkung zeigt, ist eine geeignete Modellsubstanz für die Untersuchung der Zusammenhänge von Struktur eines Cytostaticums und seiner chemotherapeutischen Wirkung. Während die meisten anderen Cytostatica der N-Lost-Reihe einem spontanen Zerfall unterliegen, konnte beim Cyclophosphamid zwischen der unwirksamen Ausgangsverbindung und den im Organismus gebildeten, cytostatisch aktiven Metaboliten unterschieden werden.

HOHORST und Mitarbeiter (13, 24) fanden nämlich, daß das Cyclophosphamid in der Leber durch mikrosomale, mischfunktionelle Oxydation

in alkylierende und cytostatisch wirksame Metabolite umgewandelt wird. Mit Ausnahme von Lunge und Niere, die eine geringe Aktivierung zeigen, kann bei der Inkubation von Gehirn, Knochenmark, Lymphknoten, Milz, Muskel, Blut und einigen Experimentaltumoren der Ratte mit Cyclophosphamid keine Freisetzung von aktiven Metaboliten beobachtet werden (36).

Als Mechanismus für diese Umwandlung des Cyclophosphamid standen - mit Ausnahme einer Hydrolyse, die von verschiedenen Autoren ausgeschlossen worden war, (7, 25) - eine oxydative O- oder N-Dealkylierung (20) zur Diskussion.
Ebenso wie REMMER und MERKER (32) den mikrosomalen Umsatz verschiedener Arzneimittel durch Induktion der Hydroxylasen mit Phenyläthyl-barbitursäure (Luminal ®) oder 1. 1-p. p' -Dichlordiphenyl-2. 2. 2. -trichloräthan (DDT) steigern konnten, wird auch die Metabolisierungsrate von Cyclophosphamid nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Luminal und DDT bis auf das zehnfache erhöht(36). Dagegen senken Inhibitoren der enzymatischen N-Dealkylierung (26), wie 2, 4-Dichlorphenol, die Umsatzrate des Cyclophosphamid auf ein viertel herab (36).

Der allgemeine Reaktionsverlauf der N-Dealkylierung lautet :

$$R\text{-}NH\text{-}CH_2R \xrightarrow[\text{Mikrosom.}]{O} R\text{-}NH\text{-}CH(OH)\text{-}R \longrightarrow R\text{-}NH_2 + R\text{-}CHO$$

Bei Übertragung dieses allgemeinen Mechanismus auf die biologische Umwandlung des Cyclophosphamid sind die aus Abb. 14 ersichtlichen Metabolite theoretisch denkbar, wenn man zusätzlich zur N-Dealkylierung eine anschließende, ebenfalls mögliche enzymatische Dehydrierung des gebildeten Aldehyds zur Carbonsäure sowie eine spontane Hydrolyse in Betracht zieht.

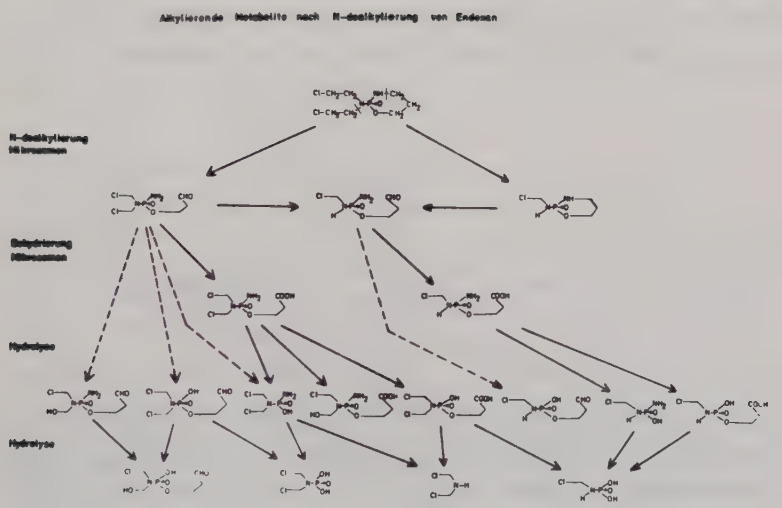


Abb. 14 : Alkylierende Metabolite nach N-Dealkylierung von Cyclophosphamid.

Alle bisher über den ersten faßbaren Cyclophosphamid-Metaboliten vorliegenden Befunde deuten darauf hin, daß bei ihm die Oxydationsstufe eines Aldehyds bereits überschritten und eine Öffnung des N',O-Propylen-Ringes eingetreten ist. Die Instabilität des Metaboliten (Rf 0.86), der auch in vitro in mehrere, papierchromatographisch nachweisbare Verbindungen gespalten wird, erklärt sich dann offen-

sichtlich damit, daß aus dieser Carbonsäure ebenso wie natürlich auch aus der theoretisch geforderten Aldehyd-Stufe durch spontane Hydrolyse weitere Metabolite entstehen können.

Die zur Erhärtung der im Rahmen dieser Arbeit postulierten Struktur des Metaboliten (Rf 0.86) durchgeführte Synthese unterliegt prinzipiell den gleichen Schwierigkeiten, wie sie bei der Isolierung des biologischen Metaboliten auftreten.

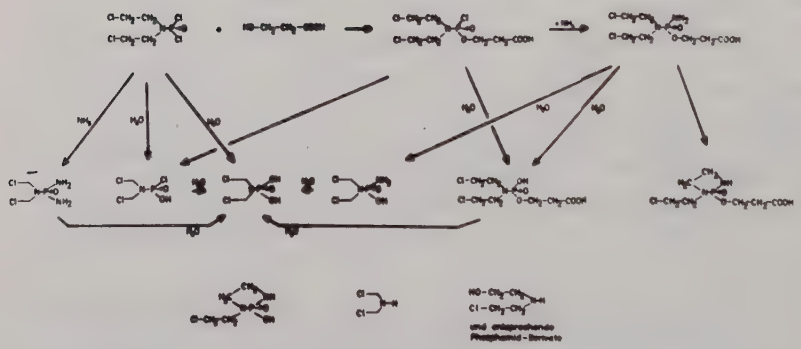
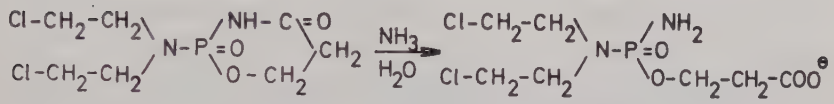


Abb. 15 : Durch Hydrolyse bedingte Nebenreaktionen bei der Synthese von N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester [XIII].

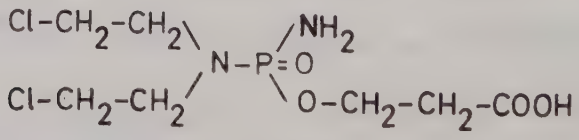
Durch die Bildung zahlreicher Neben- und Folgeprodukte (Abb. 15) ist nämlich die Reindarstellung des N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-esters erschwert, zumal eine Reinigung der Zwischenstufe durch Kristallisation oder Destillation nicht möglich war.
Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, hatten ARNOLD et. al. (40) versucht,diese Substanz nach folgendem Weg darzustellen:



"Oxo-Cyclophosphamid"

Diese Synthese verläuft im wesentlichen über die Hydrolyse eines partiell oxydierten"Oxo-Cyclophosphamid." Das nach dieser Reaktion synthetisierte Produkt erwies sich jedoch trotz ausgezeichneter Werte der Elementaranalyse als uneinheitlich im Papierchromatogramm, wobei keine Substanz bei Rf 0.86 zu finden war. In den übrigen Daten, wie Infrarotspektrum und Größe der alkylierenden Aktivität, stimmt es ebenfalls nicht mit dem Metaboliten (Rf 0.86) des Cyclophosphamid überein. Man muß daher trotz der Anwendung besonders schonender Bedingungen annehmen, daß die Hydrolyse des stabilen Oxo-Cyclophosphamids nicht in der gewünschten Richtung verlaufen ist, sondern zum ringoffenen Carbonamid geführt hat. Dagegen führt die hier beschriebene Synthese, ausgehend von N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid und 3-Hydroxypropionsäure, zu einem Produkt, welches sich im Papierchromatogramm und in der Hochspannungselektrophorese ebenso verhält wie der erste faßbare cytostatisch aktive Metabolit (Rf 0.86). Im Verlaufe

dieser Reaktion (vgl. III.) kann weder eine Carbonyl- noch eine Hydroxyl-Funktion in der Phosphorsäureester-Gruppe auftreten. Es wäre an Stelle der Veresterung mit 3-Hydroxy-propionsäure lediglich eine Acylierung der Phosphorsäure unter Ausbildung der O-(3-Hydroxy-propionyl)-Gruppe denkbar, die jedoch bei der biologischen Umwandlung des Cyclophosphamid nicht auftreten kann, selbst wenn man O-Dealkylierung und eine Hydrolyse annimmt. Auf Grund der gewonnenenen Analysendaten, der IR-Spektren und der angeführten Eigenschaften kann dem Metaboliten (Rf 0.86) und dem Syntheseprodukt [XIII] folgende Formel zugeschrieben werden :



XIII

VI. Methodik

VORBEMERKUNG:

Alle Chemikalien wurden, so weit nicht anders beschrieben, von der Firma E. Merck, Darmstadt, in p. a. Qualität bezogen. Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Heizmikroskop. Die Elementaranalysen wurden von Dr. O. Pfundt, Göttingen, durchgeführt.

VI. 1. 1. Aktivierung von Cyclophosphamid mit Leberschnitten.

50 mg Cyclophosphamid * werden mit 5 g 0.1 - 0.2 mm dicken Leberschnitten von männlichen, 150 - 200 g schweren Ratten des Stammes Wistar BR 46 ** in 50 ml Ringer-Glucose-Lösung ***, pH 7.2, inkubiert und 60 min. bei 37° C mit Luft geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren, 10 min. bei 5 000 x g, wird der Überstand mit 50 ml 0.6 N Perchlorsäure in der Kälte enteiweißt und mit 10 N Kalilauge neutralisiert. Das ausgefallene Kaliumperchlorat trennt man zunächst ab, dann wird nicht umgesetztes Cyclophosphamid sowie etwa vorhandenes N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-amin und dessen Zerfallsprodukte durch dreimaliges Ausschütteln mit je 100 ml Dichlormethan entfernt. Die wässrige Phase, die die primären Aktivierungsprodukte des Cyclophosphamid enthält, wird bei + 4°C aufbewahrt, ebenso wie alle Operationen nach der Inkubation bei + 4°C im Kühlraum erfolgen.

---

* Endoxan ®, Asta Werke AG, Chem. Fabrik. Brackwede/Westf.

** Tierzüchterei Brünger, Bockel/Westf.

*** Zusammensetzung: $NaCl : 1.25 \cdot 10^{-3}$ M
$KCl \quad 4 \cdot 10^{-3}$ M
$CaCl_2 \quad 2 \cdot 10^{-3}$ M
$NaHCO_3 \quad 25 \cdot 10^{-3}$ M

VI. 1. 2. Aktivierung von radioaktiv markiertem Cyclophosphamid mit Leberschnitten

Es werden 50 mg Cyclophosphamid ✱ zusammen mit 5 mg gereinigtem ^{3}H-Cyclophosphamid ✱✱✱✱ (spezifische Aktivität 250 µC/mg) oder ^{14}C-Cyclophosphamid ✱✱✱✱ (6 µC/mg) inkubiert und wie unter VI. 1. beschrieben aufgearbeitet. Das ^{3}H-Cyclophosphamid (37) ist in der N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-Gruppierung titriert. Das ^{14}C-Cyclophosphamid (34) ist an den ringständigen Kohlenstoffatomen radioaktiv markiert.

VI. 1. 3. Gewinnung von Metaboliten des Cyclophosphamid aus Serum (24).

Männliche Ratten des Stammes Wistar BR 46 ✱ erhalten 1000 mg/kg ^{3}H-Cyclophosphamid (spezifische Radioaktivität 2. 5 µC/mg) in 1 - 5 ml physiologischer Kochsalzlösung i. p. injiziert. Nach 30 min. wird durch Herzpunktion Blut entnommen . Die Erythrozyten werden abzentrifugiert und das Serum wird mit dem gleichen Volumen 0. 6 N Perchlorsäure in der Kälte bei max. 4^{o}C enteiweißt. Der Überstand der Eiweißfällung wird nach dem Abzentrifugieren des Proteins mit 10 N Kalilauge neutralisiert und erneut zentrifugiert. Zuletzt extrahiert man den Serumextrakt dreimal mit je 4 ml Dichlormethan. Die Metabolite des Cyclophosphamids bleiben in der wässrige Phase zurück.

✱✱✱✱ ^{3}H-Cyclophosphamid und ^{14}C-Cyclophosphamid wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. E. H. Graul, Institut für Strahlenbiologie und med. Isotopenanwendung der Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

VI. 2. Papierchromatographie

Papierchromatographische Trennungen werden absteigend auf Chromatographie-Papier 2043 b * bei + 4 °C durchgeführt. Als Laufmittel dient n-Butanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 6 : 2 : 2.
Zum Nachweis alkylierender Verbindungen wird das 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin-Reagens benutzt, modifiziert nach FRIEDMAN und BOGER (19). Dazu wird das Chromatogramm nach Trocknung bei Zimmertemperatur zunächst mit 0.025 M Acetatpuffer, pH 4.6, besprüht, dann, nach dem Antrocknen, mit einer 2.5 %igen Lösung von 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin (EGA-Chemie) in Aceton. Nachdem das Papier im Trockenschrank 10 min. auf 90°C erhitzt wurde, wird mit 0.25 N Natronlauge besprüht : die alkylierenden Verbindungen sind als blau-violette Flecke zu erkennen. Die Nachweisgrenze dieses NBP-Spray liegt bei $15 \cdot 10^{-9}$ Mol.
Phosphathaltige Verbindungen werden mit dem Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagens (23) nachgewiesen. Nachweisgrenze : $1 \cdot 10^{-7}$ Mol.
Radioaktiv markierte Verbindungen werden im Radiochromatogramm-Scanner ** ausgewertet.

VI. 3. Hochspannungselektrophorese

Die elektrophoretische Trennung erfolgt auf Elektrophorese-Papier Whatman Nr. 3 *** im Pherographen, Modell Frankfurt, *** bei 1500 V und 80 m A.. Als Puffer dient ein Gemisch von Wasser/Pyridin/Eisessig im Verhältnis 89 : 10 : 1, pH 6.0. Die Identifizierung erfolgt wie unter VI. 2. beschrieben mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin-Reagens, Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagens oder im Radiochromatogramm-Scanner.

---

* Carl Schleicher und Schüll, Dassel, Kr. Einbeck
** Modell 7200, Packard Instrument GmbH, Frankfurt
*** L. Hormuth und Vetter, Heidelberg

VI. 4. Anionenaustauscher-Chromatographie

Anionen-Austauscher Dowex 2 X 8, Korngröße 40 - 60 μ *, wird mit 8 N Ameisensäure in die Formiat-Form überführt, mit dest. Wasser neutral gewaschen und in Chromatographiesäulen, 4 x 700 mm, eingefüllt. Die Säulenkapazität beträgt 13.5 mäqu. Mit Hilfe einer Schlauchquetschpumpe ** wird die Substanzprobe in neutraler wässriger Lösung bei 4°C im Kühlraum unter 3 - 5 atm. Druck, Pumpgeschwindigkeit ca. 30 ml/h, auf die Säule aufgebracht und mit dest. Wasser nachgewaschen. Das Eluat durchläuft eine Durchflußszintillationszelle ***, gefüllt mit Anthracen (Packard Instruments), Zellenvolumen 1 ml, die an einen Tricarb-Szintillationszähler mit 2-Kanal-Ratemeter *** und 2-Kanal-Schreiber **** angeschlossen ist. Diese Anordnung der Geräte ermöglicht es, die Radioaktivität im Eluat fortlaufend zu registrieren und zwar entweder für ein Isotop gleichzeitig in zwei Konzentrationsbereichen je nach Einstellung des Meßbereichs am Ratemeter oder für gleichzeitig zwei Isotope (^{14}C und ^{3}H) durch entsprechende Wahl des Discriminatorbereichs in zwei Kanälen des Szintillationszählers.
Wenn beim Auswaschen mit dest. Wasser keine Radioaktivität mehr im Eluat nachgewiesen werden kann, wird mit einem konkaven Ameisensäure-Gradienten weiter eluiert. Der konkave Gradient (Abb. 16) wird in einem aus drei miteinander kommunizierenden Kammern bestehenden Gradienten-Mischgerät ***** eingestellt : die erste und die zweite Kammer enthalten je 50 ml dest. Wasser ; die letzte Kammer ist mit

---

* reinst, gesiebt auf Anforderung, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

** Hergestellt in der Werkstatt des Physiol. Chem. Inst. d. Univ. Marburg

*** Modell 3002 u. Modell 282A, Packard Instrument GmbH, Frankfurt

**** Modell RikaDenki, Fritz Hellige u. Co. GmbH, Freiburg Br.

***** hergestellt in der Werkstatt des Physiol.-Chem. Inst.

50 ml 8 N Ameisensäure gefüllt (35). Das Eluat wird für die gesamte Dauer des Versuchs in einem Fraktionssammler * in Fraktionen zu je 4 ml aufgefangen.

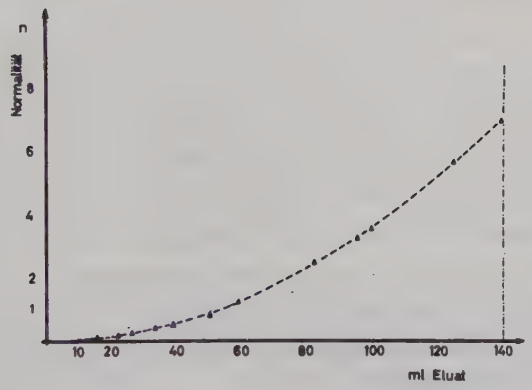


Abb. 16 : Konkaver Säuregradient
Hergestellt im 3-Kammer-Gradienten-Mischgerät
Füllung der Kammern : Kammer 1 50 ml dest. Wasser
Kammer 2 50 ml dest. Wasser
Kammer 3 50 ml 8 N Ameisen - säure

Zur präparativen Ionenaustauscher-Chromatographie werden Säulen von 3 cm ∅ und 61 cm Länge benutzt. Die Säulenkapazität beträgt 550 mäqu.. Der konkave Ameisensäuregradient wird dazu mit je 750 ml dest. Wasser in Kammer I und II und 750 ml 8 N Ameisensäure in Kammer III eingestellt.

---

* Modell RadiRac LKB-Producter A. B., Stockholm/Schweden

VI. 5. Bestimmung der alkylierenden Aktivität (NBP-Test)

Zur quantitativen Bestimmung der alkylierenden Aktivität werden 0.01 - 0.1 ml der zu untersuchenden Lösung, die 5 - 50 · 10^{-9} Mol alkylierende Substanz enthalten soll, in einem Reagensglas, 1.2 x 12 cm mit NS 14.5, mit dest. Wasser auf 3 ml verdünnt. Nach Zugabe von 1 ml 0.025 N Acetatpuffer, pH 4.6, und 0.4 ml einer 5 %igen Lösung von 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin (Ega-Chemie) in Aceton wird 20 min. im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend im Eisbad abgekühlt. Dann werden nacheinander 2 ml Aceton, 5 ml Äthylacetat und 1.5 ml 0.25 N Natronlauge zugesetzt. Nach gutem Durchmischen unter kräftigem Schütteln wird 2 min. zentrifugiert. Etwa 5 ml der oberen Phase werden vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und im Photometer Eppendorf bei = 509 nm, 25°C, Küvette d = 2 cm, ausgemessen. Nach Laugenzusatz muß die Extinktion innerhalb von 3 min. bestimmt werden, da die blaue Farbe allmählich verblaßt. An Hand einer für N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-amin aufgestellten Eichkurve läßt sich der Gehalt an alkylierender Aktivität (NBP-Titer) ermitteln. Der Extinktions-Koeffizient beträgt ε $(\lambda = 5.09,\ d = 3)$ $= 1.081 \cdot 10^{-7}$ cm^2 Mol^{-1}.

VI. 6. Radioaktivitätsmessungen

Zur quantitativen Bestimmung der Radioaktivität von ^{3}H- oder ^{14}C-markierten Verbindungen wird eine aliquote Menge, fest oder gelöst, im Probenglas ** mit Dioxan-Szintillator-Lösung * auf 15 ml aufgefüllt und im TriCarb-Szintillationszähler *** ausgezählt. Mit Hilfe

---

* Zusammensetzung.: n. G.A. BRAY (9)
60 g Naphthalin, 4 g PPO **, 200 mg Dimethyl-POPOP**, 100 ml absol. Methanol, 20 ml Äthylglykol, mit Dioxan auf 1 l auffüllen.

** Packard Instrument GmbH, Frankfurt

*** Modell 3003, Packard Instrument GmbH, Frankfurt

des externen Standards wird an Hand einer Eichkurve der Quencheffekt korrigiert und die Radioaktivität der Probe berechnet.

VI. 7. Bicarbonat-Extraktion

Um Nebenprodukte, die bei der Leberschnittinkubation oder bei der Synthese auftreten, von den primären Metaboliten weitgehend abzutrennen, wird die folgende Extraktion durchgeführt:
Die aus der Leberschnittinkubation gewonnene Lösung, oder eine 10%-ige Lösung von öligem N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxyäthyl)-phosphorsäureamid-ester (s. VI. 10) wird bei 4°C dreimal mit dem gleichen Volumen Amylalkohol ausgeschüttelt. Der benötigte Amylalkohol wird zuvor mit konz. Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3. 5 eingestellt.
Die vereinigten Amylalkohol-Phasen werden dreimal mit dem gleichen Volumen einer 2%igen wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die vereinigten Bicarbonat-Phasen, in denen der Metabolit Rf 0. 86 angereichert ist, werden durch Gefriertrocknung bis zur Trockne eingeengt. Aus diesem Trockenpulver läßt sich der Metabolit quantitativ mit Aceton extrahieren.

VI. 8. Darstellung der Ausgangsverbindungen

VI. 8. 1. N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid

VI. 8. 1. 1. Reinigung von N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid

50 g N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid (Asta Werke AG, techn.) werden bei 30°C mit 50 ml über Natrium getrocknetem Äther fast gelöst, heiß filtriert und das Filtrat bei + 4°C zur Kristalli-

sation gebracht. Die Verluste betragen 40 - 50 % des eingesetzten Dichlorids.
Fp. 55 - 56°C.

VI. 8. 1. 2. Darstellung von ^{3}H-markiertem N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid

4. 9 g N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-amin-hydrochlorid (Asta Werke AG, rein) und 100 mg N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-amin-hydrochlorid *, 100 mC, werden in 13 ml frisch destilliertem Phosphoroxid-trichlorid suspendiert und 12 Std. am Rückfluß bis zur Lösung erhitzt. Der Überschuß an Phosphoroxid-trichlorid wird im Wasserstrahlvakuum abgezogen und der Rückstand im Ölpumpenvakuum über eine Kurzweg-destillationsapparatur fraktioniert destilliert. Bei 123 - 125°C, 0. 6 mm Hg, erhält man eine wasserklare Flüssigkeit, die beim Abkühlen kristallisiert. Fp. 54 - 56°C.
Das Produkt wird, wie unter VI. 8. 1. 1. beschrieben, umkristallisiert. Auswaage 5. 3 g, das sind 74 % der Theorie. Radioaktivitätsausbeute : 80 mC, das sind 80 % der eingesetzten Radioaktivität.

VI. 8. 2. 3-Hydroxy-propionsäure

VI. 8. 2. 1. Reinigung der 3-Hydroxy-propionsäure

10 g 3-Hydroxy-propionsäure (Roth, pract.) werden dreimal mit je 30 ml Äther, extrahiert, um das vorhandene Wasser zu entfernen. Die

* N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-amin-hydrochlorid wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. E. H. Graul, Inst. für Strahlenbiologie und med. Isotopenanwendung d. Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

gesamte Ätherphase wird 12 Std. über geglühtem Natriumsulfat (wasserfrei, p. a.) getrocknet. Dann wird das Natriumsulfat abgesaugt und der Äther abdestilliert. 3-Hydroxy-propionsäure bleibt in gereinigter Form zurück.
Ausbeute 60 %.

VI. 8. 2. 2. Darstellung von ^{3}H-markierter 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure

Zu einer Mischung von 2 g ß-Propiolacton (Schuchardt) und 15. 6 mg ^{3}H-ß-Propiolacton (The Radiochemical Centre, Amersham), 25 mC, (insgesamt 28 nMol) werden langsam unter Rühren 55 ml 0. 5 N Natronlauge zugetropft. Nachdem 4 Std. am Rückfluß gekocht wurde, wird im Wasserstrahlvakuum bis zu einer Badtemperatur von 100°C eingedampft. Den Rückstand nimmt man in 4 ml dest. Wasser auf und versetzt unter Eiskühlung langsam mit 1. 36 ml (14 mMol) konz. Schwefelsäure in 8 ml dest. Wasser. Die Temperatur der Lösung darf dabei 35°C nicht überschreiten. Dann wird 4 mal mit insgesamt 150 ml Äther ausgeschüttelt und die gesamte Ätherphase 12 Std. über geglühtem Natriumsulfat, wasserfrei, getrocknet. Nach dem Entfernen des Natriumsulfats und des Äthers verbleibt 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure als sirupöse Flüssigkeit.
Auswaage : 750 mg, das sind 30 % der Theorie.
Radioaktivitätsausbeute : 11 mC, entsprechend 44 % der eingesetzten Radioaktivität.

VI. 9. Darstellung von N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäureamid-chlorid-ester

Zu 26 g (0. 1 Mol) gereinigtem N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid in 1 l über Natrium getrocknetem Benzol werden im

Dreihalskolben bei 25°C unter Rühren gleichzeitig innerhalb von 30 min. 9 g (0.1 Mol) gereinigte 3-Hydroxy-propionsäure, in 40 ml trockenem Benzol suspendiert, und 14 ml (0.09 Mol) Triäthylamin in 40 ml trockenem Benzol zugetropft. Nach 3 Stunden wird das ausgefallene Triäthylammoniumchlorid abgesaugt und mit trockenem Benzol nachgewaschen, bis der Rückstand keine alkylierende Aktivität im Test mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin zeigt. Das vereinigte Filtrat wird im Rotationsverdampfer unterhalb von 30°C eingeengt. Das zurückbleibende gelbe Öl wird dreimal mit je 50 ml über Natrium getrocknetem Äther extrahiert, um nicht umgesetzte Ausgangssubstanzen zu entfernen.
Die Reaktionsausbeute beträgt 88 % an Triäthylammoniumchlorid, bezogen auf das eingesetzte Phosphamid-dichlorid, und 70 %, bezogen auf die alkylierende Aktivität des Öles nach Äther-Extraktion.
Das Öl zeigt im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser 6 : 2 : 2, mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin-Spray einen einheitlichen Rf-Wert von 0.92.

VI. 10. Darstellung von N,N-(Bis-[2-chloräthyl])-O-(2-carboxyäthyl)-phosphorsäurediamid-ester

Das nach VI. 9. dargestellte Öl löst man in 200 ml Äthylacetat (über Al_2O_3, Akt. I, getrocknet) und leitet bei 0°C 30 min. lang trockenes Ammoniak ein. Nachdem das Reaktionsgemisch weitere 3 Std. bei +4°C stand, wird das ausgefallene Ammoniumchlorid abgesaugt und mit Äthylacetat nachgewaschen, bis der Rückstand keine alkylierende Aktivität zeigt. Nach dem Einengen der vereinigten Filtrate im Rotationsverdampfer verbleibt ein gelbes Öl, welches dreimal mit je 50 ml über Natrium getrocknetem Äther extrahiert wird.
Die Reaktionsausbeute beträgt 65 % an Ammoniumchlorid bezogen auf das eingesetzte Phosphamid-dichlorid, und 50 % bezogen auf die alkylierende Aktivität im Öl nach Äther-Extraktion.

Im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2), findet man mit dem 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin-Spray neben Rf 0.86 noch Verunreinigungen bei Rf 0.73. Die Verunreinigungen betragen etwa ein Viertel der bei Rf 0.88 enthaltenen Substanzmenge.

VI. 11. Derivate des N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-esters.

VI. 11. 1. Darstellung als Lithium- und Kalium-Salz

Kationenaustauscher Dowex 50 W x 4, 50 - 100 mesh, (Serva) wird mit 4 N Lithiumhydroxid-Lösung in die Li-Form überführt, mit dest. Wasser neutral gewaschen und in eine Chromatographiesäule, 1.5 x 85 cm, eingefüllt. Bei 4°C wird eine Lösung von 5 g (16 mMol) des nach VI. 10. erhaltenen Öles in 10 ml dest. Wasser aufgegeben und mit 100 ml dest. Wasser nachgewaschen, wobei das Eluat im Fraktionssammler * in Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen wird. Diejenigen Fraktionen, die im Test mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin alkylierende Aktivität zeigen, werden vereinigt und gefriergetrocknet. Es verbleibt ein weißes Pulver. Zur Reinigung wird das Pulver in abs. Äthanol gelöst und über eine Säule, 2 x 70 cm, gefüllt mit Cellulose (Schuchardt, f. Chromatogr., 25 - 50 μ) chromatographiert. Als Elutionsmittel dient abs. Äthanol. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels in den alkylierungsfähigen Fraktionen verbleibt das Li-Salz als amorpher Rückstand.
Ausbeute 62 % der Theorie. Fp. 147 - 149°C.
NBP-Titer : $3.0 \cdot 10^{-6}$ Mol/mg (90 % der Theorie).
Im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser 6 : 2 : 2, findet man neben Rf 0.86 etwa ein drittel der Substanzmenge bei Rf 0.73 nach Anfärben mit NBP-Spray.

Bei Anwendung von Kationenaustauscher Dowex 50 W x 4 in der K^+-Form erhält man bei gleichen Bedingungen ein amorphes Kalium-Salz.

* Modell Linear 2, Serva Entwicklungslabor Heidelberg

Fp. 220°C
NBP-Titer : $2.7 \cdot 10^{-6}$ Mol/mg (89 % der Theorie).

VI. 11. 2. Darstellung als Calcium- und Barium-Salz

5 g (16 mMol) des nach VI. 10. dargestellten Öles werden in möglichst wenig Wasser gelöst und von einer eventuellen Trübung durch Filtration über ein Faltenfilter geklärt. Auf Zusatz von 2 g (16 mMol) Calciumchlorid · 2 H_2O bei 4°C fällt ein amorpher Niederschlag aus, der mit Eiswasser, kaltem Äthanol und Äther ausgewaschen wird. Das trockene Salz wird dann in Aceton aufgenommen. Die unlöslichen Bestandteile werden abfiltriert und das Aceton-Filtrat im Rotationsverdampfer eingeengt. Zur weiteren Reinigung wird der Rückstand in abs. Äthanol gelöst und über eine Säule, 2 x 70 cm, gefüllt mit Cellulose (Schuchardt f. Chromatographie, 25 - 50 μ),chromatographiert. Als Elutionsmittel dient abs. Äthanol. In den alkylierungsfähigen Fraktionen, verbleibt nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels amorphes Calciumsalz.
Der Schmelzpunkt liegt oberhalb von 260°C.
NBP-Titer : $30 \cdot 10^{-6}$ Mol/mg (94 % der Theorie)
Im Papierchromatogramm, System Butanol/Eisessig/Wasser 6 : 2 : 2, tritt neben dem NBP-positiven Calcium-Salz [XIII] bei Rf 0. 86 nur noch eine NBP-negative, Phosphat-positive Verunreinigung bei Rf 0. 2 - 0. 3 auf.

Unter analogen Bedingungen erhält man durch Ausfällen mit Bariumchlorid ein Barium-Salz, welches ebenfalls gut in Aceton löslich ist. Im Gegensatz zum Calciumsalz besitzt es jedoch eine beträchtliche Wasserlöslichkeit, sodaß die Verluste bei der Darstellung hier wesentlich größer sind.
Fp. oberhalb von 220°C
NBP-Titer : $2.5 \cdot 10^{-6}$ Mol/mg (90 % der Theorie).

VI. 11. 3. Umsetzung mit Triäthylamin

5 g (16 mMol) des nach VI. 10. hergestellten Öles werden in 20 ml Aceton gelöst und mit 2. 5 ml (16 mMol) Triäthylamin versetzt. Die bei $4^{o}C$ nach 12 Std. gebildeten Kristalle werden abgesaugt, mit wenig eiskaltem Aceton ausgewaschen und aus heißem Dichlormethan umkristallisiert. Man erhält 1. 5 g stabförmige Kristalle (23 % der Theorie), die bei $142^{o}C$ schmelzen. Der NBP-Titer beträgt $1.25 \cdot 10^{-6}$ Mol/mg, entsprechend 98 % des theoretisch zu erwartenden Wertes.

VI. 12. Radioaktive Synthese von markiertem N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester[XIII]

VI. 12. 1. Markierung mit ^{3}H in der N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-Gruppierung des Moleküls [XIII]

4 g gereinigtes N, N-(Bis-[2-chloräthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid werden zusammen mit 1 g ^{3}H-markiertem N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid, 15 mC, (insgesamt 19 mMol) wie unter VI. 9. beschrieben mit 1. 7 g (19 mMol) 3-Hydroxy-propionsäure und 3 ml (18 mMol) Triäthylamin umgesetzt. Die Radioaktivitätsausbeute beträgt 7. 2 mC (47 % der eingesetzten Radioaktivität.
Die Reaktionsausbeute liegt bei 75 %, bezogen auf die alkylierende Aktivität des Öles nach Äther-Extraktion.

Nach Lösen des Öles in Äthylacetat, Einleiten von trockenem Ammoniak und Aufarbeitung nach VI. 10. erhält man tritiierten N, N-(Bis-[2-chlor-^{3}H-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester als gelbes Öl. Radioaktivitätsausbeute 6. 6 mC (44 %). Reaktionsausbeute : 65 %, bezogen auf die alkylierende Aktivität im Öl nach Äther-Extraktion

VI. 13. 2. Markierung mit ^{3}H in der (2-Carboxy-äthyl)-Gruppierung des Moleküls [XIII]

5 g (19 mMol) gereinigtes N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-phosphorsäureamid-dichlorid setzt man wie unter VI. 9. beschrieben mit 1. 7 g (19 mMol) tritiierter 3-Hydroxy-^{3}H-propionsäure, 5. 5 mC, und 3 ml (18 mMol) Triäthylamin um.
Die Radioaktivitätsausbeute beträgt bei gleicher Reaktionsausbeute 49 % der Theorie, das sind 2. 7 mC.

Nach Ammoniak-Einleiten, wie unter VI. 10 beschrieben, erhält man in der 2-Carboxy-äthyl-Gruppe tritiierten N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-^{3}H-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester bei einer Radioaktivitätsausbeute von 2. 2 mC (40 % der eingesetzten Radioaktivität).

VII. Zusammenfassung

Cyclophosphamid (N, N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-N', O-propylen-phosphorsäurediamid-ester) wird in Leber, Lunge und Niere von Warmblütern durch mikrosomale mischfunktionelle Oxydation in alkylierende und cytostatisch wirksame Metabolite umgewandelt.

Nach Inkubation von ^{3}H-Cyclophosphamid mit Leberschnitten der Ratte lassen sich im Inkubat nach Dichlormethan-Extraktion ebenso wie im Rattenserum nach Injektion von ^{3}H-Cyclophosphamid insgesamt acht radioaktive Fraktionen durch Chromatographie an Anionenaustauschern nachweisen. Auf zwei der Fraktionen entfallen 30 % der im Chromatogramm eingesetzten Radioaktivität und 80 % der alkylierenden Aktivität - gemessen im Test mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin. Diese beiden Fraktionen, die den beiden primären Cyclophosphamid-Metaboliten zugeordnet werden können, lassen sich aus einem Gemisch mit den übrigen Metaboliten durch Extraktion mit Amylalkohol und Natriumbicarbonat-Lösung anreichern. In einer anschließenden Trennung durch Ionenaustauscherchromatographie treten nur noch fünf radioaktive Fraktionen auf.

Das erste faßbare biologische Umwandlungsprodukt, papierchromatographisch durch den Rf-Wert 0.86 gekennzeichnet, wird isoliert und durch seine analytischen und spektralen Daten charakterisiert. Die Metabolite nach biologischer "Aktivierung" von ringmarkiertem und in der Seitenkette markiertem Cyclophosphamid werden im Radiopapierchromatogramm verglichen.

Bei der enzymatischen Oxydation von Cyclophosphamid durch Modell-Enzym-Systeme tritt ebenfalls u. a. der primäre alkylierungsfähige Metabolit (Rf 0.86) auf, allerdings in wesentlich niedrigeren Konzentrationen als bei der Leberschnittinkubation.

Zur Bestätigung der Struktur des Metaboliten (Rf 0.86) wird N,N-(Bis-[2-chlor-äthyl])-O-(2-carboxy-äthyl)-phosphorsäurediamid-ester synthetisch dargestellt und durch Einbau von radioaktiven Vorstufen einmal in der (2-Chlor-äthyl)- zum anderen in der (2-Carboxy-äthyl)-Gruppe mit Tritium markiert. Das unmarkierte und die beiden tritiierten Formen des Syntheseproduktes stimmen bezüglich des Rf-Wertes im Papierchromatogramm, im Verhalten an Anionenaustauschern, im IR-Spektrum, in der alkylierenden Aktivität und in der Hydrolyse-empfindlichkeit mit dem aus Leberinkubaten mit Cyclophosphamid isolierten primären Metaboliten überein.

Auf Grund der Struktur wird der Mechanismus der biologischen Umwandlung diskutiert.

VIII. Literaturverzeichnis

1. Arnold, H., F. Bourseaux und N. Brock;
"Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamidester".
Naturwissenschaften 45, 64 (1958)

2. Arnold, H., und F. Bourseaux;
"Synthese und Abbau zytostatisch wirksamer zyklischer N-Phosphamidester des Bis-(ß-chloräthyl)-amins".
Angew. Chem. 70, 539 (1958)

3. Arnold, H., und H. Klose;
"Die Hydrolyse hexacyclischer N-Lostphosphamidester im gepufferten System".
Arzneimittel-Forsch. 10, 288 (1960)

4. Arnold, H., und H. Klose;
"Über den hydrolytischen Abbau des hexazyklischen N-Lost-phosphamidesters ENDOXAN unter physiologischen Bedingungen".
Arzneimittel-Forsch. 11, 159 (1961)

5. Arnold, H., und F. Bourseaux;
"Synthese des N,N-Bis-(2-chloräthyl)-O-(3-aminopropyl)-phosphorsäure-amidesters".
Arzneimittel-Forsch. 13, 927 (1963)

6. Arnold, H.;
"Synthese und zytostatische Wirkung von N-Lost-Derivaten".
Fortschr. chem. Forsch. 7, 196 (1966)

7. Back, N., T. J. Bardos, Z. F. Chmielewicz, E. Achter and A. E. Munson;
"Studies On The Mechanism Of Action Of Cyclophosphamide And AB-132 With The Aid Of Radioprotective Agents".
Life Sciences 3, 803 (1965)

8. Bellamy, L. J.;
"The Infrared Spectra Of Complex Molecules".
(Methueny and Co., LTD, London 1962)

9. Bray, G. A.;
"A Simple Efficient Liquid Scintillator For Counting Aqueous Solutions In A Liquid Scintillation Counter".
Analyt. Biochem. 1, 279 (1960)

10. Brock, N.;
"Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutika".
Arzneimittel-Forsch. 8, 1 (1958)

11. Brock, N., und H. Wilmanns;
"Wirkung eines zyklischen N-Lost-Phosphamidesters auf experimentell erzeugte Tumoren der Ratte. Chemotherapeutische Wirksamkeit und pharmakologische Eigenschaften von B 518 ASTA".
Dtsch. med. Wschr. 83, 453 (1958)

12. Brock, N., und H. J. Hohorst;
"Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus".
Naturwissenschaften 49, 610 (1962)

13. Brock, N., und H. J. Hohorst;
"Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro".
Arzneimittel-Forsch. 13, 1021 (1963)

14. Brock, N., und H. J. Hohorst;
"Metabolism Of Cyclophosphamide".
Cancer, Philad. 20, 900 (1967)

15. Druckrey, H., und S. Raabe;
"Organspezifische Chemotherapie des Krebses (Prostata-Karzinom)".
Klin. Wschr. 30, 882 (1952)

16. Foley, G. E., O. M. Friedman and B. P. Drolet;
"Studies On The Mechanism Of Action Of Cytoxan. Evidence Of Activation in vivo And in vitro".
Cancer Res. 21, 57 (1961)

17. Friedman, O. M., and A. M. Seligman;
"Preparation Of N-Phosphorylated Derivatives Of Bis-ß-chloro-ethylamine".
J. Amer. chem. Soc. 76, 655 (1954)

18. Friedman, O. M., H. Sommer and G. E. Foley;
"Cytotoxic Activity Of Cytoxyl Alcohol, A Possible Primary Hydrolytic Product Of Cytoxan".
Proc. amer. Ass. Cancer Res. 3, 112 (1960)

19. Friedman, O. M., and E. Boger;
"Colorimetric Estimation Of Nitrogen Mustards In Aqeous Media".
Anal. Chem. 33, 906 (1961)

20. Gilette, J. R.;
"Metabolism Of Drugs And Other Foreign Compounds By Enzymatic Mechanisms".
Progr. Drug Res. 6, 11 (1963)

21. Graul, E. H., E. Schaumlöffel, H. Hundeshagen, H. Wilmanns and G. Simon;
"Metabolism Of Radioactive Cyclophosphamide".
Cancer, Philad. 20, 896 (1967)

22. Grunicke, H., M. Liersch, H. Holzer und H. Arnold;
"Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Endoxan".
Biochem. Pharmacol. 14, 1485 (1965)

23. Hanes, C. S., and F. A. Isherwood;
"Separation Of The Phosphoric Esters On The Filter Paper Chromatogram".
Nature, Lond. 164, 1107 (1949)

24. Hohorst, H. J., A. Ziemann und N. Brock;
"Alkylierende Substanzen in Serum und Urin nach Injektion von Cyclophosphamid".
Arzneimittel-Forsch. 15, 432 (1965)

25. Hohorst, H. J., A. Ziemann und N. Brock;
"Herkunft und Spiegel von N, N-Bis-(2-chloräthyl)-amin im Serum nach Injektion von N, N-Bis-(2-chloräthyl)-N', O-propylenphosphorsäureester-diamid".
Arzneimittel-Forsch. 16, 1529 (1966)

26. Kampfmeyer, H., und M. Kiese;
"Einige Eigenschaften der Anilin-hydroxylierenden Enzyme in Mikrosomen".
Arch. exp. Path. Pharmakol. 244, 375 (1963)

27. Rauen, H. M., und U. Dirschka;
"Bis-(ß-chloräthyl)-amin und N-ß-Chloräthyl-aziridin als Folgeprodukte der biologischen Aktivierung von Cyclophosphamid".
Arzneimittel-Forsch. 14, 159 (1964)

28. Rauen, H. M., A. Reisch und H. Schriewer;
"Zum biochemischen Wirkungsmechanismus von Cyclophosphamid".
Arzneimittel-Forsch. 14, 176 (1964)

29. Rauen, H. M.;
"Die Bildungsgeschwindigkeiten von N-ß-Halogen-äthyl-aziridinen aus Bis-(ß-halogenäthyl)-aminen unter physio-

logischen Bedingungen".
Arzneimittel-Forsch. 14, 855 (1964)

30. Rauen, H. M., und K. Norpoth;
"Die biologische Aktivierung von ENDOXAN".
Naturwissenschaften 52, 477 (1965)

31. Rauen, H. M., und K. Norpoth;
"Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen an Metaboliten des N, N-Bis(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamids aus dem Serum der Ratte".
Arzneimittel-Forsch. 17, 599 (1967)

32. Remmer, H., and H. J. Merker;
"Drug-induced Changes In The Liver Endoplasmatic Reticulum: Assoziation With Drug-metabolizing Enzymes".
Science 142, 1957 (1963)

33. Ritzl, F., W. Bolt und H. Nahrmann;
"Untersuchungen über Abbau, Verteilung und Ausscheidung von Tritium-markiertem Cyclophosphamid im menschlichen Organismus. II. Umbau des Zytostatikums in vivo".
Klin. Wschr. 40, 837 (1962)

34. Schweer, K. H.;
"Die Darstellung von im Esteramidring mit ^{14}C und ^{32}P markiertem [Bis-(ß-chloräthyl)-amido]-phosphorsäure-N. O-trimethylen-esteramid (ENDOXAN)".
Chem. Ber. 95, 1799 (1962)

35. Sonneborn, M.;
"Kurzzeitchromatographie der Adenin- und Pyridin-Nucleotide aus säurelöslichen Gewebsextrakten an Ionenaustauschern im Mikromaßstab".
(Diplomarbeit, Marburg 1965)

36. Sonneborn, M., A. Ziemann and H. J. Hohorst;
"The Metabolisation Of Cyclophosphamide By Microsomal Oxidation".
5th. Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc., Prag 1968, Abstr. No. 445

37. Steiner, B., H. Arnold, E. H. Graul, H. Bekel, H. Hundeshagen und W. Wilmanns;
"Zur Synthese von tritiummarkiertem Cyclophosphamid (einem Krebschemotherapeutikum)hoher spezifischer Aktivität".
Atompraxis 10, 358 (1964)

38. Udenfriend, S., C. T. Clark, J. Axelrod and B. B. Brodie;
"Ascorbic Acid In Aromatic Hydroxylation : I. A Model System For Aromatic Hydroxylation".
J. biol. Chem. 208, 731 (1954)

39. Wheeler, G. P.;
"Some Biochemical Effects Of Akylating Agents".
Fed. Proc. 26, 885 (1967)

40. DBP : Nr. P 17 930 10.8 angem. 23.7.1968
Erf.: H. Arnold, F. Bourseaux, E. Heidenreich, N. Brock, H. J. Hohorst, A. Ziemann und M. Sonneborn;
"O-Phosphorylierte Derivate der Hydracrylsäure und ihrer Amide, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung".

Herrn Professor Dr. Dr. H. J. Hohorst danke ich für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und für vielseitige Diskussion.

Frau Heide Podzelny, geb. Scheplitz, und Herrn Achim Ziemann danke ich vielmals für ihre technische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Am 31. März 1937 wurde ich in Wilhelmshaven als erster Sohn des Oberstudienrates Walter Sonneborn und seiner Ehefrau Johanna, geb. Nied, geboren. In Marburg/Lahn besuchte ich vom September 1943 bis September 1947 die Volksschule, anschließend das humanistische Gymnasium, wo ich im März 1957 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1957/58 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg mit dem Studium der Naturwissenschaften.
Ab Wintersemester 1958/59 studierte ich Chemie.
Am 31. Oktober 1961 legte ich die Diplomchemiker-Vorprüfung und am 17. 12. 1963 die Diplomchemiker-Hauptprüfung ab. Zwischendurch studierte ich im Sommersemester 1962 an der Freien Universität in Berlin.
Nach der Diplomarbeit mit dem Thema " Kurzzeitchromatographie der Adenin- und Pyridin-Nucleotide aus saurelöslichen Gewebsextrakten an Ionenaustauschern in Mikromaßstab" fertigte ich am Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität, Marburg, die vorliegende Arbeit in der Zeit vom August 1965 bis Dezember 1968 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H.-J. Hohorst an.
Ab Mai 1965 bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität beschäftigt.

Verzeichnis der akademischen Lehrer.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten :

Dimroth, Drawert, Graul, Hafner, Hengge, Hensel,
Hohorst, Huster, Kautsky, Karlson, Kirmse, H. Kuhn,
Mahr, Manecke, Musso, Petry, Pfeil, Rohen, W. Schmid,
M. Schmidt, Seidel, Starke, Walcher, Witzel, Zilliken.